

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平10-506379

(43) 公表日 平成10年(1998) 6月23日

(51) Int.Cl.<sup>8</sup>

識別記号

F I

C 0 7 C 59/68

C 0 7 C 59/68

C 0 7 B 61/00

C 0 7 B 61/00

Z

C 0 7 C 65/21

C 0 7 C 65/21

C

281/02

281/02

281/06

281/06

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全126頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願平8-505990

(86) (22) 出願日

平成7年(1995) 7月26日

(85) 翻訳文提出日

平成9年(1997) 1月27日

(86) 国際出願番号

P C T / U S 9 5 / 0 9 6 1 4

(87) 国際公開番号

W O 9 6 / 0 3 4 1 8

(87) 国際公開日

平成8年(1996) 2月8日

(31) 優先権主張番号

0 8 / 2 8 1 , 2 0 0

(32) 優先日

1994年7月26日

(33) 優先権主張国

米国 (U S)

(31) 優先権主張番号

0 8 / 4 8 4 , 1 5 3

(32) 優先日

1995年6月7日

(33) 優先権主張国

米国 (U S)

(71) 出願人 ザ・スクリプス・リサーチ・インスティテュート

アメリカ合衆国カリフォルニア州92037,

ラホーラ, ノース・トーレイ・バインズ・

ロード 10550

(72) 発明者 ジャンダ, キム

アメリカ合衆国カリフォルニア州92117,

サン・ディエゴ, エリー・ストリート

3181

(74) 代理人 弁理士 社本 一夫 (外5名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 可溶性の組合せライブラリー

(57) 【要約】

本発明は、コア分子に結合した溶液状態の可溶相を含み、かつ可溶性組合せライブラリーの改良された高収量かつ効率的な生成を可能にする新規の可溶性組合せライブラリーに関する。本明細書に審査請求する可溶性組合せライブラリーの二三の具体的な例は1種以上の次のものを含む。すなわち、アミノ酸、 $\alpha$ -アゼチドアミノ酸、トリアジンジオン分子、 $\gamma$ -ラクタムチド分子、 $\delta$ -ラクタムチオチド分子、 $\beta$ -ラクタム核含有分子、リコリミナルカロイド核含有分子および $\beta$ -ブロッカー核分子。さらに、組合せ分子のライブラリーを生成させる分割合成法は、プール、分割およびカップリングの工程中は可溶であるが、洗浄工程中は不溶である二相性高分子担体を使用する。二相性高分子担体の可溶相における使用は、プール、分割、およびカップリングの工程の効率および性能を著しく高める。二相性高分子担体の不溶相における使用は洗浄工程の効率および性能を著しく高める。

(2)

特表平10-506379

## 【特許請求の範囲】

1. 1組のコア分子またはコア分子群を含み、前記コア分子または前記コア分子群がそれぞれ可溶性ポリマー化合物に結合している可溶性組合せライブラリー。
2. 前記1組のコア分子または前記関連分子群中の分子は化学部分が1つ以上異なる請求項1記載の可溶性組合せライブラリー。
3. 前記可溶性ポリマー化合物が、PEG、ポリビニルアルコール、およびポリビニルピロリドンと共重合したポリビニルアミンより成る群から選ばれる請求項1記載の可溶性組合せライブラリー。
4. 前記1組のコア分子が $\alpha$ -アゼチド組成物を含む請求項1記載の可溶性組合せライブラリー。
5. 前記1組のコア分子がトリアジンジオン組成物を含む請求項1記載の可溶性組合せライブラリー。
6. 前記1組のコア分子が $\gamma$ -ラクタムチド組成物を含む請求項1記載の可溶性組合せライブラリー。
7. 前記1組のコア分子が $\delta$ -ラクタムチオチド組成物を含む請求項1記載の可溶性組合せライブラリー。
8. 前記1組のコア分子が $\beta$ -ラクタム核含有組成物を含む請求項1記載の可溶性組合せライブラリー。
9. 前記1組のコア分子がリコラミンアルカロイド核含有組成物を含む請求項1記載の可溶性組合せライブラリー。
10. 前記1組のコア分子が $\beta$ -ブロッカー核組成物を含む請求項1記載の可溶性組合せライブラリー。
11.  $\alpha$ -アゼチド組成物の集団を含む可溶性組合せライブラリー。
12. トリアジンジオン組成物の集団を含む可溶性組合せライブラリー。
13.  $\gamma$ -ラクタムチド組成物の集団を含む可溶性組合せライブラリー。
14.  $\delta$ -ラクタムチオチド組成物の集団を含む可溶性組合せライブラリー。
15.  $\beta$ -ラクタム核含有組成物の集団を含む可溶性組合せライブラリー。
16. リコラミンアルカロイド核含有組成物の集団を含む可溶性組合せライブラリー。

(3)

特表平10-506379

リー。

17.  $\beta$ -ブロッカー核組成物の集団を含む可溶性組合せライブラリー。

18. 可溶性ポリマー化合物に結合したコア分子を付与する工程を含む可溶性組合せライブラリーを生成させる方法。

19. 一連のコア分子中の特定位置にコア分子をランダムに結合させることによって組成の異なる分子集団を効率的に生成させる可溶性組合せライブラリーを生成させる方法において、前記コア分子集団それぞれの前記第1コア分子を可溶性ポリマー化合物に付加させる方法。

20. 1組のコア分子を合成する工程を含む可溶性組合せライブラリーを生成させる方法において、前記合成工程に関与する各コア分子を溶液状態に溶解させる方法。

21. 分割合成を行う工程を含む可溶性組合せライブラリーを生成させる方法において、前記分割合成を溶液状態で行う方法。

22. 組合せ分子のライブラリーを生成させる改良法であって、該方法が下記の工程A：高分子担体を共通プール内に集めて混合し、このとき各高分子担体には初期の組合せ分子が結合されており；ついで

工程B：前記工程Aの共通プールの高分子担体を分割して一連の別個の反応容器に移し；ついで

工程C：反応体を付加して、前記工程Bの各別個の反応容器内の該高分子担体に結合した該初期の組合せ分子を伸長させ、さらに

工程D：前記工程C後に、該高分子担体を洗浄して、担体から反応体を除去し、次に

前記工程A、B、CおよびDを必要なだけ繰返して、組合せ分子のライブラリーを生成させる工程の連続を包含する少なくとも2サイクルの並行分割合成法を用いる方法において、次のように、

前記工程A、B、CおよびDにおいて該高分子担体は二相性であり；

前記工程Cにおいて、該高分子担体を可溶にする第1溶剤を用いることによって、該初期の組合せ分子の伸長を容易にし；

(4)

特表平10-506379

前記工程Dにおいて、該高分子担体を不溶にする第2溶剤を用いることによって、該高分子担体の洗浄および該反応体の除去を容易にすることを特徴とする方法。

23. 請求項22記載の組合せ分子のライブラリーを生成させる改良法においてさらに次のように

前記工程Cにおいて、該高分子担体が、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンと共重合したポリビニルアミン、およびそれらの誘導体より成る群から選ばれることを特徴とする方法。

24. 請求項23記載の組合せ分子のライブラリーを生成させる改良法において、さらに次のように

前記工程Cにおいて、該高分子担体がポリエチレングリコール（PEG）を含むことを特徴とする方法。

25. 請求項23記載の組合せ分子のライブラリーを生成させる改良法において、さらに次のように

前記工程Cにおいて、該第1溶剤がアルコール類を含み、かつ

前記工程Dにおいて、該第2溶剤がエーテル類を含むことを特徴とする方法。

26. 請求項22記載の組合せ分子のライブラリーを生成させる改良法であって、該ライブラリーの該組合せ分子がオリゴペプチド、オリゴ糖、オリゴヌクレオチド、アリアルスルホンアミド、およびそれらの誘導体より成る群から選ばれる方法において、さらに次のように、

前記工程Cにおいて、該第1溶剤がアルコール類を含みかつ該高分子担体がポリエチレングリコール（PEG）、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンと共重合したポリビニルアミン、およびこれらの誘導体より成る群から選ばれ、さらに

前記工程Dにおいて、該第2溶剤がエーテル類を含むことを特徴とする方法。

27. デコンボリューション群（deconvolution assemblage）と相まって、組合せ分子のライブラリーを生成させる改良法であって、該方法が次の

工程A：高分子担体を共通のプールに集めて混合し、各高分子担体には初期の



(5)

特表平10-506379

組合せ分子が結合されており、さらに

工程B：前記工程Aの該共通プールの高分子担体を分割して一連の別個の反応容器に移し、さらに

工程C：反応体を付加することによって、前記工程Bの各別個の反応容器内の該高分子担体に結合した初期の組合せ分子を伸長させ、さらに

工程D：前記工程C後に該高分子担体を洗浄してそれから反応体を除去し、さらに

工程E：前記工程D後に、各反応容器から該高分子担体の一部を取り出してデコンポリューション群を生成させ、次に

前記工程A、B、C、DおよびEを必要なだけ繰返して組合せ分子のライブラリーを生成させる工程の連続を包含する少なくとも2サイクルの並行分割合成法を用いる方法において、

前記工程A、B、C、DおよびEにおいて、該高分子担体が二相性であり、

前記工程Cにおいて、該高分子担体を可溶にする第1溶剤を用いることによって該初期の組合せ分子の伸長を容易にし、

前記工程Dにおいて、該高分子担体を不溶にする第2溶剤を用いることによって、該高分子担体の洗浄および該反応体の除去を容易にすることを特徴とする方法。

28. 請求項27記載の組合せ分子のライブラリーを生成させる改良法においてさらに、次のように

前記工程Cにおいて、該高分子担体がポリエチレングリコール(PEG)、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンと共重合したポリビニルアミンおよびそれらの誘導体より成る群から選ばれることを特徴とする方法。

29. 請求項28記載の組合せ分子のライブラリーを生成させる改良法において、さらに次のように

前記工程Cにおいて、該高分子担体がポリエチレングリコール(PEG)を含むことを特徴とする方法。

30. 請求項28記載の組合せ分子のライブラリーを生成させる改良法において

(6)

特表平10-506379

、さらに次のように

前記工程Cにおいて、該第1溶剤がアルコール類を含み、かつ

前記工程Dにおいて、該第2溶剤がエーテル類を含むことを特徴とする方法。

31. 請求項27記載の組合せ分子のライブラリーを生成させる改良法であって

、  
該ライブラリーの該組合せ分子がオリゴペプチド、オリゴ糖、オリゴヌクレオチド、アリアルスルホンアミド、およびそれらの誘導体より成る群から選ばれる方法において、さらに次のように

前記工程Cにおいて、該第1溶剤がアルコール類を含み、かつ該高分子担体がポリエチレングリコール（PEG）、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンと共重合したポリビニルアミンおよびそれらの誘導体より成る群から選ばれ、さらに

前記工程Dにおいて、該第2溶剤がエーテル類を含むことを特徴とする方法。

32. 組合せ分子のライブラリーを生成させる方法において、該方法が、次の

工程A：二相性高分子担体を共通のプール内に集めて混合し、各二相性高分子担体には初期の組合せ分子が結合されており、さらに

工程B：前記工程Aの共通プールの二相性高分子担体を分割して、一連の別個の反応容器に移し、さらに

工程C：該二相性高分子担体を可溶にする第1溶剤の存在下で反応体を加えることによって、前記工程Bの各別個の反応容器内の該二相性高分子担体に結合した該初期の組合せ分子を伸長させ、さらに

工程D：該二相性高分子担体を不溶にする第2溶剤の存在下で前記工程C後に該二相性高分子担体を洗浄して反応体を除き、

前記工程A、B、C、およびDを必要なだけ繰返して、組合せ分子の該ライブラリーを生成させる工程の連続を含む少なくとも2サイクルの並行分割合成法を用いる方法。

33. 請求項31記載の組合せ分子のライブラリーを生成させる方法において、さらに次のように

(7)

特表平10-506379

前記工程Cにおいて、該二相性高分子担体がポリエチレングリコール（PEG）、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンと共重合したポリビニルアミン、およびそれらの誘導体より成る群から選ばれることを特徴とする方法。

34. 請求項33記載の組合せ分子のライブラリーを生成させる方法において、さらに次のように

前記工程Cにおいて、該二相性高分子担体がポリエチレングリコール（PEG）

を含むことを特徴とする方法。

35. 請求項33記載の組合せ分子のライブラリーを生成させる方法において、さらに次のように

前記工程Cにおいて、該第1溶剤がアルコール類を含みかつ

前記工程Dにおいて、該第2溶剤がエーテル類を含むことを特徴とする方法。

36. 請求項32記載の組合せ分子のライブラリーを生成させる方法であって、該ライブラリーの該組合せ分子が、オリゴペプチド、オリゴ糖、オリゴヌクレオチド、アリアルスルホンアミド、およびそれらの誘導体より成る群から選ばれる方法において、該方法がさらに次のように

前記工程Cにおいて、該第1溶剤がアルコール類を含み、かつ該高分子担体がポリエチレングリコール（PEG）、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンと共重合したポリビニルアミン、およびそれらの誘導体より成る群から選ばれ、さらに

前記工程Dにおいて、該第2溶剤がエーテル類を含むことを特徴とする方法。

37. 請求項32記載の組合せ分子のライブラリーを生成させる方法において、さらに下記付加工程、

工程E：前記工程D後に、該反応容器から該高分子担体の一部を除いてデコンボリューション群をつくることを特徴とする方法。

38.  $\alpha$ -アゼチド組成物の集団を含む組合せライブラリーを生成させる方法。

(8)

特表平10-506379

**【発明の詳細な説明】****可溶性の組合せライブラリー****参照すべき関連特許出願**

本特許出願は、係属中の出願である米国特許出願第08/281,200号（1994年7月26日付け出願）および米国特許出願第08/484,153号（1995年6月7日付け出願）の一部継続出願である。

**発明の背景**

本発明は、可溶性の組合せライブラリー (soluble combinatorial libraries) およびこうした可溶性の組合せライブラリーの合成法に関する。このようなライブラリーは、薬物発見の努力をすすめていく上で、また他の科学研究にとって有用である。

化合物の多様なコレクションまたはライブラリーを速やかに得ることは、薬理学的活性に関して多数の新規化合物又はダイバーソマー (diversomers) を選別しようとしている研究者にとって重要な目標である。組合せ合成 (combinatorial synthesis) を使用して、分子のライブラリーが造り出されている。これらのライブラリーは、モノマーサブユニットの逐次的付加により得られるオリゴマー分子またはポリマー分子からなることが多い。しかしながら一般には、こうして得られるライブラリーは不溶性であり、溶液の形で合成されない。

ダウアー (Dower) らによるWO 91/19818 (PCT/US91/04384) は、バクテリオファージ被覆タンパク質の融合タンパク質として表されているペプチドライブラリーについて開示している。

ダウアーらによるWO 93/06121 (PCT/US92/07815) は、ランダムオリゴマーを合成する方法、および所望の特性を有するオリゴマーを識別するための識別タグ (identification tag) の使用について開示している。

エルマン (Ellman) による米国特許第5,288,514号は、固体支持体上へのベンゾジアゼピン化合物の固相合成および組合せ合成について開示している。

ヒューブナー (Huebner) による米国特許第5,182,366号は、樹脂混合物の使用によるペプチド混合物の制御された合成について開示している。ホーテン

(9)

特表平10-506379

(Houghten) らによる “354ネイチャー 84, 1991” および WO 92/09300 (PCT/US91/08694) は、基礎研究および薬物の発見を進めていく上での、合成ペプチド組合せライブラリーの生成とその使用について開示している。これらのライブラリーは、不均質ライブラリーを形成する遊離ペプチドの混合物で構成されている。最適ペプチドリガンドの系統的な識別は、ライブラリーをスクリーニングし、次いで繰り返し選択と合成プロセスによって達成される。例えば、あるライブラリーは、特異的に画定された最初の 2 つの位置と、18L-アミノ酸のランダム混合物からなる最後の 4 つの位置とを有する、一連の 6 つの残基ペプチド (residue peptides) からなっていた。このライブラリーをスクリーニングして、画定されたペプチドのどのペアがアッセイにおいて最適の活性を有しているかを決定した。次いで、最適ペアのペプチドが含まれていて、各ペプチドの第 3 の位置が個別に合成されていて、そして最後の 3 つのペプチドが 18L-アミノ酸のランダム混合物からなるという第 2 のライブラリーを合成した。このライブラリーを上記のようにスクリーニングし、最適の 6 つの残基ペプチドが識別されるまでプロセスを繰り返した。ホーテンらは次のように述べている。

“全体で数億のペプチドの系統的スクリーニングが可能な、他の多くのライブラリー (例えば、完全に D-アミノ酸で構成されているライブラリー) を合成した。SPCL (synthetic peptide combinatorial libraries; 合成ペプチド組合せライブラリー) の基本的な特徴は、遊離のペプチドを生成させ、実質的に全ての現行のアッセイシステムにおいて、アッセイに最も適用可能な各ペプチドの濃度にて溶液の形で使用できる、という点にある。このアプローチは、放射性受容体アッセイ (アベン様作用ペプチド) およびブランク抑制アッセイ [ヒトの免疫不全ウイルス (HIV-1) および単純性疱疹ウイルス (HSV)] に使用してうまくいっている。前述したように、SPCL は、ペプチドが関与する薬物の発見と研究のあらゆる分野に大いに役立つ。”

ラム (Lam) らによる “354ネイチャー 82, 1991” と WO 92/00091 (PCT/US91/04666) 、およびホーテンらによる “354ネイチャー 84, 1991” と WO 92/

09300 (PCT/US91/08694) は、ペプチドと構造の明確な他のライブラリーの系統

(10)

特表平10-506379

的合成とスクリーニングについて開示している。使用している方法は、無数のビーズからなる大きなペプチドライブラリーをスクリーニングするという、1 ビーズ-1 ペプチド法 (one bead one peptide approach) に基づいている。各ビーズが単一のペプチドを含んでいる。著者らは次のように述べている。

“ペプチド合成のプロトコルにおいて活性化アミノ酸のランダム混合物を使用することは明らかに充分とは言えない。なぜなら、異種アミノ酸のカップリング速度が大きく異なるために表示 (representation) が等しくなくなり、また各ビーズが異種ペプチドの混合物を含むようになるからである。我々の解決策は “スプリット合成 (split synthesis)” 法を使用することであった。最初のサイクルは、レジンビーズのプールをそれぞれ単一のアミノ酸を含んだ別個の反応容器中に分配し、カップリング反応を完全に起こさせ、そしてビーズを再びプールすることからなっていた。このサイクルを数回繰り返して、ペプチド鎖を延ばした。このようにすれば、各ビーズは1つだけのペプチド種を含むはずである。

ビーズのライブラリーを染色法によってスクリーニングし、染色されたビーズを顕微鏡を使用して見えるようにし、そしてこれらを除去した。ペプチドの構造は、単一ビーズ上の物質の化学分析によって得られる。ラムらは次のように述べている。

“さらに、我々のアプローチは、D-アミノ酸もしくは非天然アミノ酸だけでなく環状ペプチドを含む特異的な二次的構造を組み込んだライブラリーを合成する際に、十分に確立されたペプチド化学の豊富な内容を適用する上ではるかに大きな可能性を有している。こうした合成の全てを、合成生成物の記録を残す必要なく行うことができる。我々の関心は、受容体に強い相互作用シグナルを与えるペプチドに向けられているからである。”

これらの組合せライブラリーは、固相〔例えばビーズ、レジン、またはファイバー〕で合成されており、溶液状態では合成されていない。薬物発見のプロセスは、高処理量のスクリーニングプロセスを自動化したロボット工学によるベンチ

マークアッセイの出現によって容易になった。新薬になりそうな物質をより簡単

(11)

特表平10-506379

にスクリーニングできるので、新薬可能性物質を見いだす必要性が高まっている。新薬可能性物質のライブラリーを生成させるために、組合せ化学 (combinatorial chemistry) ——多様な分子構造体のパラレル合成を可能にする——を使用することができる [ホッジソン (Hodgson), J., Bio/Technology 11: 683-688, 1993]。

組合せライブラリーは、組合せ的に配列されたサブコンポーネントを有する分子の集合である。サブコンポーネントがいずれも同じ部類に属する場合、組合せライブラリーを構成している分子はポリマーもしくはオリゴマーである。サブコンポーネントが異なった部類に属する場合、組合せライブラリーまたは組合せライブラリー中の分子の種々のサブセットを構成する分子は、非オリゴマーの複素環式化合物であってもよい。組合せライブラリーはスプリット合成法によって得られ、このとき、組合せ配列の反応容器中に収容されている初期ライブラリー成分に、サブコンポーネントがパラレル方式にて加えられる。各サブコンポーネントを加えた後に、初期ライブラリー成分を洗浄し、プールし、混合し、そして引き続きパラレル反応容器の組に分割してさらに分子を延ばす。ライブラリーが得られるまで (このとき各ライブラリー成分は所望数のサブユニットを有する)、スプリット合成のプロセス自体を繰り返す。一度に1つの分子種だけを生成する逐次化学 (serial chemistry) と異なって、組合せ化学は、組合せの規則 (combinatorics) に従って予測される仕方で、指数関数的に多様な分子を造り出せる可能性を有している (すなわち、Janda, K.D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10779-10785, 1994)。

組合せ化学は、高収率の反応生成物を与える一般的な反応計画と反応プロトコルを優先的に使用する。この目的に対し、組合せライブラリーを生成させるための好ましい方法として固相のポリマー担持合成が開発された [例えば、ブーニン B.A. とエルマンによる "J. Am. Chem. Soc. 114:10997-10998, 1992" ; ホップス・デウィット, S. キーラー, J.S. スタンコビッチ, C.J. シュローダー, M.C. レイノルズ, コディ D.M. およびバヴィア M.R. による "Proc. Natl. Acad. Sci. U SA"]。

(12)

特表平10-506379

90:6909-6913, 1993” ; チェンC, アルバークL.A., ミラーR.B., ジョーンズA.D. およびカースM.J.による “J. Am. Chem. Soc. 116:2661-2262, 1994” ; 及びバックスJ.B.とエルマンJ.A.による “J. Am. Chem. Soc. 116:11171-11172, 1994” ]。固相ポリマー担持合成は、初期ライブラリー分子を組み上げることでできる不溶性のマトリックス基質を使用する。この不溶性マトリックス基質を、各延長工程の後に洗浄する。次いで生成物をプールし、第2のあるいは引き続いた反応容器の組に分割して、必要に応じてさらなる延長工程を施す。

固相法は組合せ化学における好ましい方法であるけれども、この方法はある特定の欠点を有する。最も大きな欠点は反応条件が不均一であるということであり、このため以下のような問題点のうちの幾つかが現れることがある。

- a) 速度論的挙動が非線形である ;
- b) 化学反応の分布および/または起こりやすさが均一でない ;
- c) 溶媒和の問題 ;
- d) 不溶性の試剤または触媒を使用する ; および
- e) 固相合成に付きものの単に合成上の問題。

求められているものは、組合せ化学のための固相合成の代替法、すなわち、より高い収率をもたらす、上記の欠点を軽減するような方法である。組合せ化学の分野をはずれて、後述するように、二相支持体 (biphasic support) が個々の分子の逐次合成と関連づけて使用される。ポリエチレングリコール (PEG) は、その物理的・化学的特性が適切であることから、逐次化学の分野において従来から使用されている二相支持体である。PEGポリマーは、2,000から20,000までの種々の分子量のものが市販されており、フルカ (Fluka) 社、シグマ (Sigma) 社、およびアルドリッチ (Aldrich) 社から、非保護または保護処理の単官能化もしくは二官能化ポリマー (例えばPEGのモノメチルエーテル) として購入することができる。

PEG物品は、殆どの反応混合物および有機溶媒に対して溶解性である (w/v: ベンゼン10%, CCl<sub>4</sub>10%, ジオキサン10%, メタノール20%, ピリジン40%, CHCl<sub>3</sub>47%, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>53%, H<sub>2</sub>O55%, EtOH20%, 34℃の



(13)

特表平10-506379

EtOH 1%, 32℃のEtOH 0.1%, 20℃のジエチルエーテル0.01%)。しかしながら、ジエチルエーテルにさらすと沈殿が生じ、これによって簡単な分離と、20℃エタノール中での結晶化が可能となる。他のポリマーと異なって、PEGはゲル状沈殿物を形成しにくい。

PEGは、オリゴヌクレオチド、オリゴ糖類、およびペプチドの逐次合成と逐次精製と結びつけて二相支持体として使用されている。PEGは通常、エステル結合を介してコア分子に連結される（例えば、PEG上の遊離ヒドロキシルが、コア分子上の遊離ヒドロキシルに対するスクシネート結合を介してエステル化される）。しかしながら、PEGに対してはアミド結合やエーテル結合も同様に可能である。

E. バイエルら（ネイチャー 237:512, 1972）は、ペプチドの合成に対しPEGを二相支持体として使用することを説明している。バイエルはさらに、PEGの可溶性能力が、最大12残基の鎖長をもつオリゴマーの合成を可能にするのに充分である、ということを開示している。さらに、最大10~15個のアミノ酸残基鎖長をもつオリゴマーがリンカー（たとえばスクシネート結合）として使用される場合、PEG結合ペプチドの物理化学的特性はポリマーエステル基によって支配される。PEGは、非晶質ペプチドブロックに結合した後でも、その結晶質相をかなり保持するが、より長いペプチド（残基の数が20個を超えるペプチド）の合成は、主要なシーケンス、側鎖の保護、およびペプチドの配座によって大きく異なる。

ボノラ（Bonora）らによる“ヌクレオシドとヌクレオチド10:269, 1991”は、PEGを二相支持体として使用した大規模ジデオキシヌクレオチド合成について開示しており、シーケンス：d（TAGCGCTA）を有するオクタヌクレオチドの合成に対して90%以上の高い収率を報告している。環状オリゴデオキシリボヌクレオチドの合成の場合もPEG支持体の有用性が示されており、沈殿条件と結晶化精製条件の例が挙げられている（ボノラらによる“ヌクレオシドとヌクレオチド12:21, 1993”）。

ボノラは、これらのオリゴヌクレオチドを合成する上で、二相支持体が、固相

(14)

特表平10-506379

支持体システムに比較して幾つかの利点を有していることを開示している。すなわち、

- a) 反応混合物からのオリゴヌクレオチドの分離がクリーン且つ簡便であり、これによって精製時間が短縮される；
- b) ミリグラム量での小さなオリゴヌクレオチドの合成が経済的である；および
- c) 溶液相有機化学 (solution phase organic chemistry) が使用できるという利点がある (例えば、TLCもしくはHPLC、種々の試薬、および種々の温度・圧力条件によってモニターすることができる)。

クレピンスキー (Krepinsky) らは、PEGの結晶化精製特性を使用した、小さなPEG結合二糖類のミリグラム量合成について開示している。この合成の重要なポイントは、PEGを炭水化物ヒドロキシル基に結合させるときに、グリコシル化剤を繰り返し加えることによって、グリコシル化反応を実質的に完全に起こさせることができるということである。引き続き過剰な試剤を、沈殿したPEG結合生成物から洗い落とし、所望の長さのポリマーが得られるまでプロセスを繰り返す (クレピンスキーらによる "J. Am. Chem. Soc. 113:5095, 1191" )。

PEG (ポリエチレングリコール) は、沈殿と結晶化が容易であるという特性のために、逐次合成に対する好ましい二相支持体である。しかしながら逐次化学の分野では、これに代わる二相支持体も知られている。代替の二相支持体としては、ポリビニルアルコール-ポリビニルピロリドン共重合体およびポリビニルアミン-ポリビニルピロリドン共重合体などがある (バイエルらによる "ネイチャー-237:512, 1972" )。

#### 発明の要約

本発明によれば、可溶性の組合せライブラリーを合成するための新規な方法が提供される。この方法を使用すれば、不溶性固相の場合とは対照的に、可溶性相 (soluble phase) においてこのような合成を行うことができる。この方法によれば、新規なライブラリーを高収率で容易に造ることができ、またより効率的な手段によって評価することができる。本発明の可溶性の組合せライブラリーが溶解

(15)

特表平10-506379

状態で合成されるだけでなく、組合せライブラリー自体も、いったん合成されると可溶性となる。

組合せライブラリーは、次のような特徴を有する分子の集合体 (assemblages) である。すなわち、コア分子の化学構造または組成が異なる；コア分子の集合体の化学構造または組成が異なる；あるいはコア分子の化学成分 (chemical moieties) もしくは基の化学構造または組成が異なる。可溶性の組合せライブラリーは、可溶性分子で構成される組合せライブラリーであり、このライブラリーの合成は溶液中で行われ、例えば固体支持体 (例えば、ビーズまたはファイバー) 上では行われない。むしろ、ライブラリーの分子は可溶性のポリマー化合物に結合する。

本発明の可溶性の組合せライブラリーは、薬理学的に活性で且つ薬効のある薬物可能性物質である多くの分子を速やかに生成させ、これを識別するのに特に有用である。本発明により、薬理学的活性分子のセットの、速やかで、効率的で、そして簡便な生成とスクリーニングが可能となる。薬理学的に活性な分子または分子のセットがいったん識別されたら、再び本発明を使用して、分子または分子のセットを若干変えることによって、活性分子または活性分子のセットを最適化することができる。

本発明の利点は、生物学的に活性であって可能性のありそうな広範囲の化合物に対して、効率的な合成と自動化されたスクリーニングが可能になるということである。

本発明 (詳細については後述する) は、関連した又は構造的に類似した分子のセットで構成された可溶性の組合せライブラリーを特徴とし、このとき各分子は可溶性のポリマー分子に結合している。本発明は、可溶性の組合せライブラリーを合成する効率的な方法、および可溶性の組合せライブラリーを生成させるための組成物を含む。本発明は、合成のフォーマットにおいて大きなフレキシビリティをもたらす。

1つの実施態様においては、本発明は、ライブラリー分子の改良された操作、より大きなライブラリーの生成、およびライブラリーを構成している組成物の改

(16)

特表平10-506379

良された効率的な精製を可能にする可溶性の組合せライブラリーである。さらに、組合せライブラリー自体は溶液に対して溶解性であり、これは従来の固相合成を凌ぐ利点である。

好ましい実施態様においては、可溶性の組合せライブラリーは“コアー分子”または“コアー分子の集合体”で構成されている。コアー分子は、共通の化学構造または官能成分を共有し、可溶性の組合せライブラリーの個性を決定する化合物である。しかしながら、コアー分子または分子の集合体は、1つ以上の化学成分が異なってもよい。

“コアー分子のセット”とは、個々の化学成分が異なっている2つ以上のコアー分子である。“コアー分子の集合体”とは、化学的に繋がった一連の2つ以上のコアー分子である。

コアー分子の例（これによって本発明の範囲が限定されることはない）としては、アミノ酸、 $\alpha$ -アゼチドアミノ酸、トリアジンジオン分子、 $\gamma$ -ラクタムチド分子、 $\delta$ -ラクタムチオチド分子、 $\beta$ -ラクタム核含有分子、リコラミンアルカロイド核含有分子、 $\beta$ -遮断薬核 ( $\beta$ -blocker nucleus) 分子、またはこれらの組合せ物などがある。

“可溶性ポリマー化合物”は、所望のライブラリー合成反応を起こさせようとする溶媒中に溶解させることのできる分子である。単独では不溶性である関連化合物が、いったん可溶性ポリマー化合物に結合すると、所望の溶媒中に溶解するようになる場合がある。このようにすれば、試剤を溶液の形でコアー分子と反応させることができる。一般には、溶液中でのこのような反応は、可溶性ポリマー化合物に結合していないコアー分子と試剤とが反応するときは、非効率的であるかまたは不可能である。

本発明では、可溶性ポリマー化合物に関して合成することによって、固相合成によって得られる収量より数桁大きい収量が得られる。一般に、本発明ではミリグラムまたはグラムレベルの生成物が得られ、本発明の収量は限度がない場合もある。これとは対照的に、固相合成では、ナノグラムレベルの生成物しか得られない。

(17)

特表平10-506379

本発明の可溶性組合せライブラリーを合成する際に使用する可溶性ポリマー化合物は、コア分子と反応させようとする化学物質に対して不活性であるが、化学的に活性であってもよい。コア分子は、試剤と可溶性ポリマー化合物との間に望ましくない副反応を引き起こす恐れなく、試剤で処理することができる。さらに、可溶性ポリマー化合物は、コア分子またはコア分子からの生成物と反応しない他の特定の化学物質と反応してもよい。

可溶性ポリマー化合物のさらなる利点は、効率的な単離と所望生成物の回収を容易にすることである。

可溶性ポリマー化合物は、濾過やクロマトグラフィー法（当業者にはよく知られている）によって容易に単離できるようなサイズおよび重量でよい。

さらに、可溶性ポリマー化合物は、コア分子から開裂可能であってもよい。可溶性ポリマー化合物とは反応するが、コア分子とは反応しない試剤と化学物質を使用することにより、可溶性ポリマー化合物を不溶性となるよう化学的に変性させることができ、これによって結合したコア分子の精製と単離が容易になる。

本発明を使用して可溶性の組合せライブラリーを生成させることができ、これを後で不溶性にすることができる。したがって本発明は、従来の合成およびライブラリー〔例えば、固相合成によって得られるライブラリー（不溶性ライブラリー）〕のもつ全ての利点を有しており、また従来の合成およびライブラリーによっては得られなかった多くのさらなる利点を有する。これらのさらなる利点の幾つかは、速やかで効率的な生成、高い収量、および可溶性組合せライブラリーの生成などである。

可溶性ポリマー化合物は、結合しているコア分子を可溶性ポリマー化合物から開裂させ、そして回収できるよう、他の化学物質と反応させることができる。

“組成物 (Composition)” は、1つ以上の化学成分を加えるかまたは取り除くかして化学的に変性させたコア分子のセットの1つである。

ライブラリーは、異なった化学成分を含んだ化合物のいかなる組合せで構成されていてもよい。これらの化合物は、従来の化学的方法によって、あるいは酵素

(18)

特表平10-506379

を使用することによって合成することができる。化学成分は、天然物であっても非天然物であってもよく、アミノ酸（メチオニン中のヒドロキシル基のようなアミノ酸のR基）、ヌクレオチドもしくはその一部、糖類、脂質、および炭水化物を含む。それぞれの基を結びつけるのに使用される結合は、共有結合、イオン結合、および配位結合を含めたいかなるタイプの結合であってもよい。これらの結合は、酵素または化学的処理によって選択的に開裂することができる。

本発明は、可溶性化合物が結合しているために幾つかの効率的な方法によって単離・精製することのできるコア分子の多様なセットを迅速且つ効率的に生成させることができるので有用である。可溶性化合物は、結合したままであってもよいし、あるいは精製のいかなる段階で必要に応じて開裂してもよい。例えば、PEGを可溶性化合物として使用すると、膜濾過または沈殿によって迅速且つ効率的な単離が可能となる。

本発明はさらに、従来の固相合成によって得られるライブラリーより大きなライブラリーの生成に対して有用である。

本発明はさらに、新規の治療用分子 (therapeutic molecules) をスクリーニングするのに有用である。例えば、本発明により、このような治療用分子を受容体作用薬または受容体拮抗薬としてスクリーニングすることができる。

さらに、 $\alpha$ -アザアミノ酸を主鎖として使用すれば、ライブラリー分子を経口投与できる可能性が生じる。この可能性は、 $\alpha$ -アザアミノ酸が簡単には加水分解されないという事実によるものである。さらに、 $\alpha$ -アザアミノ酸では、従来のアミノ酸の $\alpha$ -炭素が窒素で置き換えられている。この窒素は、 $\alpha$ -アゼチドを含んだライブラリー分子に薬理的活性を増大させる可能性がある。

他の態様においては、本発明は、本発明の可溶性反応法 (soluble-reaction method) または他の全ての組合せライブラリー生成法（当業者には周知のもの）によって結びつけることのできる以下のような組成物を特徴とする： $\alpha$ -アゼチド組成物；トリアジンジオン組成物（核酸様の化合物である）； $\gamma$ -ラクタムチドおよび $\delta$ -ラクタムチオチド（後者は保護処理したシステインから誘導することができる）； $\beta$ -ラクタム核（このとき化学基を変えてもよい）；リコラミン

(19)

特表平10-506379

アルカロイド核（このとき化学成分またはそれに結合した基を変えてもよい）；および、例えばナフトール環またはフェノール環を含んだ $\beta$ -遮断薬核（このとき化学成分または環のまわりの基を変えてもよい）。

さらに以下のような組合せライブラリーが提供される：2つ以上の酸素原子と少なくとも1つの化学成分または基を有する複素環式化合物を含んだポリ酸素化合物ライブラリー（このとき前記化合物は、ペプチドもしくはペプチド様の主鎖に沿って結合させることができる）；アリールオキシ酢酸ライブラリー；ポリエーテル主鎖化合物ライブラリー；ピリジル主鎖化合物ライブラリー；およびジデオキシヌクレオチド化合物ライブラリー。

好ましい実施態様では、可溶性組合せライブラリーの合成は、ポリエチレングリコール（PEG）を、組合せライブラリーの初期コア分子が結びつく可溶性ポリマー化合物として使用する。可溶性のポリマー保護基（soluble, polymeric protecting group）としては、例えば、ポリビニルアルコールまたはポリビニルアミンとポリビニルピロリドンとの共重合体がある。組合せライブラリーを生成させる際には、一般には多くのコア分子が使用され、通常は、反応容器1つ当たり1つのコア分子が使用される。

必要に応じて、各反応容器において沈殿工程を行ってもよい。この沈殿工程により、PEGに結合していないコア分子からのPEG分子の精製が可能となる。なぜならPEG分子だけが沈殿し、溶液中に残存しているコア分子から分離できるからである。精製工程の後、ミキシング工程を行うことができる。次いでこの混合したPEG分子を別のコア分子と反応させることができる。所望数のコア分子が結合するまでこのプロセスを続ける。最後に、PEGを開裂して、結合したコア分子を所望の生成物として得る。

他の実施態様においては、共有している構造成分（structural elements）は1つ以上のペプチド結合であり、また化学成分はポリ酸素化された複素環式化合物である。

他の実施態様においては、共有構造成分は $\beta$ -ラクタムであり、化学成分は、 $\beta$ -ラクタムのカルボキシ官能基またはアミノ官能基に結合してもよい。カルボ

(20)

特表平10-506379

キシ官能基に結合してもよい化学成分としては、アルコール、アミノ酸、およびアミンなどがあるが、これらに限定されない。アミノ基に結合してもよい化学成分としては、エステル、アミノ酸、カルバメート、およびチオエステルなどがあるが、これらに限定されない。

本発明の他のさらなる目的、特徴、および利点は、本発明の好ましい実施態様についての下記の説明から明らかとなる。

本発明は、組合せ分子のライブラリーを生成させるための改良された方法を提供すること目的としている。本発明の方法は、パラレルスプリット合成の少なくとも2つのサイクルを使用する。パラレルスプリット合成のサイクルは、共通のプール中に二相高分子支持体 (biphasic macromolecular supports) を集めてミキシングすることによって始まる。それぞれの高分子支持体は、それに結合した初期ライブラリー分子を有する。次いで、二相高分子支持体の共通のプールを分割し、一連の別個の反応容器に移す。二相高分子支持体を溶解性にする第1の溶媒 (例えばアルコール) 中で、反応容器に反応物をパラレルに加えることによって、各別個の反応容器中にて初期ライブラリー分子が延長される。次いで、第2の溶媒を加えることによって二相高分子支持体を不溶性にし、洗浄して反応物を取り除く。次いで必要に応じてサイクルを繰り返して、組合せ分子のライブラリーを生成させることができる。

好ましい態様においては、二相高分子支持体は、ポリエチレングリコール (PEG)、ポリビニルアルコール、ポリビニルアミンとポリビニルピロリドンの共重合体、およびこれらの誘導体からなる群から選ばれる。これらの二相高分子支持体は、アルコールを加えることによって可溶性になり、またエーテルを加えることによって不溶性になる。好ましい組合せ分子としては、オリゴペプチド、オリゴ糖類、オリゴヌクレオチド、アリアルスルホンアミド、およびこれらの誘導体などがある。

他の好ましい態様においては、組合せ分子のライブラリーと並行してデコンボリューション集合体 (deconvolution assemblage) を合成する。デコンボリューション集合体は、アッセイによりポジティブと識別された組合せ分子の個性をデ



(21)

特表平10-506379

コンポリュートするのに使用することができる。デコンポリューション集合体は、高分子支持体のアリコートをし、洗浄工程後に各反応容器から取り出すことによって形成される。

二相高分子支持体を使用するパラレルスプリット合成は、面倒な中間体精製手順を必要としない段階的合成であるという利点を有する。アミノ酸、ヌクレオチド、アリアルスルホンアミド、または糖残基は、二相高分子支持体に可逆的・共有結合的に結合していることが明らかとなっており、これによって、合成の全段階を通じて成長するオリゴマー鎖の物理的・化学的特性が決まる。反応はいずれも、標準的な溶液相有機化学にしたがって行われる。これにより、必要に応じて種々の量（例えば、化学量論や大過剰）の試剤を使用するためのフレキシビリティがもたらされ、反応を完全に進行させるために反応時間を長くしたり、また反応温度を変えたりすることができる。さらに、標準的なTLC分析やHPLC分析によって反応をモニターすることができる。さらなる利点は、簡単な精製および／または結晶化手順（これは二相高分子支持体によるものである）によって、ポリマー結合コア分子を可溶性試剤から精製できるという点である。二相高分子支持体はさらに、試剤とは分子サイズが異なるという利点を有しており、したがって、カップリング工程後に生成物を精製するには、単に膜濾過などによる透析によって濾過すればよいだけである（E. バイエルらによる“ネイチャー 237:512, 1972”）。

二相高分子支持体を使用すると、次のような利点が得られる。

- 1) 合成サイクルが単純化され、精製法は、濾過、沈殿、および／または結晶化という手段を使用する（これは、二相高分子支持体に特徴的な物理的特性を反映している）。したがって、オリゴマーの合成に必要なトータル時間が短縮される。
- 2) コア分子と二相高分子支持体との間の共有結合（例えば、ポリマーエステル基）によって、コア分子の溶解性を高めることができる（例えばペプチド）。
- 3) 二相高分子支持体に対して濾過、沈殿、または結晶化という手段を適用

(22)

特表平10-506379

すると、比較的成本のかからない方法を使用することができ、また同時に、生成物を高収率にて速やかに生成させることができる。

要するに、二相高分子支持体を使用すると、組合せ分子のライブラリーを生成させるためのパラレルスプリット合成（プール工程、スプリット工程、および延長工程が液相中で行われ、一方、洗浄工程が固相で行われる）が達成される。このアプローチを適用することによって、固相組合せ合成の欠点が解消されるとともに、その優れた面は保持される。これとは逆に、液相合成は固相組合せ合成のような欠点をもたない。こうした方策は液相組合せ合成（Liquid Combinatorial Synthesis; LPCS）と呼ばれる。

LPCSの好ましい実施態様においては、線状ホモポリマー〔ポリエチレングリコールモノメチルエーテル（MeO-PEG）〕を二相高分子支持体として使用する。MeO-PEGはさらに、合成される化合物のライブラリーのための末端保護基としても機能する。この単官能ポリマーは、ペプチド、オリゴヌクレオチド、およびオリゴ糖類の合成にうまく使用できるので、ホモポリマー“保護基”として選択されている（バイエルE.とムッターM.による“ネイチャー 237:512-513, 1972”；ボノラG.M., スクレミンC.L., コロンナF.P.およびカルベシA.による“Nucleic Acid Res. 18:3155-3159, 1990”；ならびにダグラスS.P., ホイットフィールドD.M.およびクレビンスキーJ.J.による“J. Am. Chem. Soc. 113:5095-5097, 1991”）。

このホモポリマーの構造組成に固有の2つの特性により、このホモポリマーは組合せフォーマットにおいて魅力ある物質となっている。第一に、らせん状構造のために、MeO-PEGは強い結晶化傾向を有する（ラジャセクハラN.ビライV.N.およびムッターM.による“Acc. Chem. Res. 14:122-130, 1981”）。したがって、ライブラリーの構成中にポリマーが不変のままである限り、組合せプロセスの各段階において結晶化による精製を行うことができる。第二に、MeO-PEGは、種々の水性溶媒および有機溶媒中にて顕著な可溶化効果を示す（バイエルE., ムッターM., ポスターJ.およびユーマンR.らによる“Pept. Proc. Eur. pept. Sympo. 13:129-136, 1975”）。この可溶化させるという特徴（“液相”プロセスにおい

(23)

特表平10-506379

て認められる)は、ホモポリマーを“試剤”として処理し、そしてこれを大過剰に使用すれば、有利な仕方で行うことができる。このような条件下では、定量的な反応を達成することができる。これとは対照的に、従来の固相合成では、このタイプの代替化学 (alternative chemistry) を使用して組み合わせユーザー (combinatorial user) を提供することはできない。MeO-PEGの好ましい溶解性特性がもつさらに他の利点は、スプリット合成を含めて、LPCS法における全ての操作を均一な条件下で行うことができる、という点である。さらに、LPCSは溶液相プロセスであるので、我々の“帰納的なデコンボリューション・ストラテジー (recursive deconvolution strategy)”を使用して、問題とするライブラリーを生成させ、これをスクリーニングすることができる (エルプE., ジャンダK. D., およびブレナーS.による “Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11422-11426, 1994”)。最後に、個々の組合せ反応工程からの収量を、炭素-13またはプロトン核磁気共鳴分光学によってモニターすることができる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、 $\beta$ -遮断薬組成物の可溶性組合せライブラリーの合成を示している。

図2は、ラクタムチド組成物の可溶性組合せライブラリーの合成を示している。

。

図3は、ラクタムチオチド組成物の可溶性組合せライブラリーの合成を示している。

図4は、 $\gamma$ -ラクタムペプチド組成物の可溶性組合せライブラリーの合成を示している。

図5は、アリールオキシ酢酸組成物の可溶性組合せライブラリーの合成を示している。

図6は、ポリエーテル主鎖組成物の可溶性組合せライブラリーの合成を示している。

図7は、高度に酸素化されたアミノ酸組成物の可溶性組合せライブラリーの合成を示している。

図8は、高度に酸素化されたアミノ酸組成物の可溶性組合せライブラリーの合成を示している。

(24)

特表平10-506379

図9は、高度に酸素化された組成物の可溶性組合せライブラリーの合成を示している。

図10は、トリアジンジオン組成物の可溶性組合せライブラリーの合成を示している。

図11は、ヌクレオシド類縁体組成物の可溶性組合せライブラリーの合成を示している。

図12は、リコラミン組成物の可溶性組合せライブラリーの合成を示している。

図13は、 $\beta$ -ラクタム組成部の可溶性組合せライブラリーの合成を示している。

図14は、アザアミノ酸組成物の可溶性組合せライブラリーの合成を示している。

図15は、アザペプチド組成物の可溶性組合せライブラリーの合成を示している。

図16は、可溶性支持体に関して帰納的なデコンボリューションを使用した、組合せライブラリー合成の概略図である。

図17は、コア分子11と12の合成を示している。

図18は、コア分子23と24の合成を示している。

図19は、コア分子へのPEG支持体の結合を示している。

図20は、ライブラリー2の合成を示している。

図21は、ライブラリー3の合成を示している。

図22は、ライブラリー4の合成を示している。

図23は、ライブラリー5の合成を示している。

図24は、ライブラリーの最終的な精製を示している。

図25は、PEG支持体を使用したヌクレオチドスプリット合成を示している。

図26は、PEG支持体を使用したオリゴヌクレオチドスプリット合成を示している。

図27は、5回のカップリング後のヘキサマーを示している。

図28は、[Leu<sup>3</sup>] =エンケファリン-ウシ血清アルブミン結合体の合成を示している。

(25)

特表平10-506379

図29は、アリールスルホンアミドの2つの合成法を示している。

図30は、アリールスルホンアミドライブラリーの構成を示している。

図31は、モノクローナル抗体3E7によって認識される抗原決定基Tyg-Gly-

Gly-Phe-Leuを含んだペプチドライブラリーの帰納的デコンボリューションを示している。

図32は、アリールスルホンアミド誘導体7を示している。

図33は、化合物3～8の構造を示している。

図34は、化合物4～18の構造を示している。

図35は、化合物19～24の構造を示している。

図36は、化合物501～503の構造を示している。

図37は、化合物504～506の構造を示している。

図38は、化合物507～508の構造を示している。

図39は、化合物509～511の構造を示している。

図40は、化合物512～514の構造を示している。

図41は、アザージペプチドのワンポット合成 (one-pot synthesis) を示している。

図42は、種々のアザージペプチドの収率を示している。

図43は、MeO-PEG支持体によるアザージペプチド合成の概略を示している。

#### 発明の詳細な説明

可溶性組合せライブラリーが提供される。このような組合せライブラリーは、コア分子のより簡単で改良された操作を可能にし、より大きなライブラリーの生成を可能にし、またライブラリーを構成している組成物のより簡単でより効率的な精製を可能にする。さらに、組合せライブラリー自体は、可溶性ポリマー化合物に基づいていったん合成されると可溶性である。

本発明は、組合せライブラリーの合成に関する。本発明の重要なポイントは、分子構造、分子サイズ、またはこれらの両方が異なるコア分子を有する分子の多様なライブラリーを速やかに且つ効率的に生成できるという点である。

組合せ分子とデコンボリューション集合体のライブラリーを同時に生成させ

(26)

特表平10-506379

るための、パラレルスプリット合成の一般化されたプロトコルが、スキーム1に示されている。可溶性支持体、すなわち二相高分子支持体を、一連の $n$ 個のパラレル反応容器 ( $n$  parallel reaction vessels) 中に等分または分割する。一連の反応

容器のそれぞれに、一連の $n$ 個のコア分子 ( $n$  core molecules) の対応する化学種を加える。たとえば、第1のコア分子を第1の反応容器に加え、第2のコア分子を第2の反応容器に加えることができる。次いで、コア分子を可溶性支持体 (すなわち二相高分子支持体) に結合させて、初期組合せ分子を形成させるか、あるいは初期組合せ分子を延長する。次に二相高分子支持体を結晶化させるか、あるいは固相に転化させて洗浄する。洗浄した生成物のそれぞれを、二相高分子支持体に対して再び可溶化し、アリコートを採取し、そして保存してデコンボリューション集合体を形成させる。残部は共通のプールに加える。この共通のプールをミキシングし、第2の一連の反応容器に分割する。延長、洗浄、および分割のサイクルをもう一度繰り返す。組合せ分子の完全なライブラリーが生成されるまで、必要に応じてこのサイクルを繰り返すことができる。

本発明の実際上の有用性は以下のとおりである。本発明は、特に新薬の開発に有用である。本発明はさらに、数多くの薬物可能性分子の速やかな生成・開発に有用である。本発明はさらに、化学構造または化学組成が大きく異なるか、あるいは化学構造または化学組成が少しか異なる数多くの分子を系統的に合成するのに有用である。本発明はさらに、数多くの薬物可能性物質をランダムに生成させ、医薬品として最も可能性のあるものを最適化するのに有用である。

組合せライブラリーを生成するのに使用される方法 (たとえばスプリット合成法) はさらに、本発明の組合せライブラリーとも適合する。スプリット合成は以下のように行われる: 第1の工程は、10個の別個の容器に10種の異なった分子A, B, C...Jを加えることである。これらの容器の内容物をミキシングまたはプールし、10個の新たな異なった容器中に分割し、そして10個のさらなるパラレル合成を行ってコア分子XA1, XB1, XC1...XJ1を生成させる。このときXは最初のA~Jのいずれか1つであり、A1, B1, C1...J1は、A~Jと同一でも異なっている

(27)

特表平10-506379

よい10種の異なった分子である。当然のことながら、この第2の工程においては、10種より少ない合成を使用しても、あるいは10種より多い合成を使用してもよい。第3の工程において、容器の内容物を再び混合し、それぞれの所望のコアー分子の全体が合成されるまで合成手順を繰り返せるよう、10個のさらなる容

器に分割する。

上記の例における最終的な10個の容器（それぞれの容器が、多様なコアー分子、コアー分子化学基、および／または末端に公知のサブユニットを有するコアー分子集合体を含む）を、標準的なアッセイフォーマットを使用して分析評価することができる。すなわち、10個の混合物のそれぞれを分析評価して、どの混合物が1種以上の活性化合物を含有しているかを決定する。

このような組合せライブラリーは、数十、数千、あるいはそれ以上の分子を含んでもよい。本発明によって生成させることのできるコアー分子の数は、実質上無限である。たとえば、ある特定の酵素受容体部位に結びつくことのできる分子の大きなライブラリーを速やかに生成・スクリーニングすることができる。酵素または受容体部位に結合する分子は、以下に説明するスクリーニング法と治療法を使用して、迅速且つ正確に分析評価し、投与することができる。

組合せライブラリーの合成は、溶液中の可溶性ポリマー分子に関して行われる。本発明では、溶液中の可溶性ポリマー分子に関して組み合わせライブラリーを合成することによって、従来の方法（たとえば固相合成）より迅速で効率的なライブラリー合成が可能となる。本発明により可溶性の組合せライブラリーが得られ、このとき合成工程は溶液で行うことができる。本発明では、溶液中で合成することによって、固相合成の収率より数桁大きい収率が得られる。固相合成は一般に、数ナノグラム程度の生成物しか得られない。これとは対照的に、本発明では、溶液中で合成することによって、ミリグラムおよびグラムレベルの生成物が得られる。

可溶性ポリマー分子をコアー分子に結合させる。コアー分子は、1つ以上の共通の化学構造成分もしくは官能成分を共有する。所望の反応溶媒に対して不溶性であるコアー分子が、いったん可溶性ポリマー分子に結合すると可溶性になる場

(28)

特表平10-506379

合がある。コア分子が可溶性になると、溶液中におけるコア分子の効率的な化学操作が可能となる。

コア分子はさらに、化学成分を含んでもよい。コア分子は、可溶性ポリマー分子に結合することによっていったん溶解するようになると、分子の化学

成分に化学的変性を施すことによって化学的に変化させることができる。このように、多様なコア分子の大きなセットを生成させることができる。コア分子のある与えられたセットは、コア分子の成分を置き換えることによって多様化することができる。

本発明の明確な利点は、大きくて高度に多様化された分子のライブラリーを速やかに生成させることができるという点である。ライブラリーの高い多様性にコア分子はさらに、化学成分 (chemical moieties) を含んでもよい。コア分子は、いったん可溶性ポリマー分子に結合することによって溶解するようより、大きな多様性をもつコア分子に関して迅速且つ正確な実験および分析評価を行うことができる。

本発明は、薬理学的活性に関してスクリーニングすることのできる数多くのコア分子を生成・単離するのに特に有用である。次いで、大きなセットの分子を治療用途に関してスクリーニングすることができる。いったん可能性のあるターゲット分子が識別されたら、本発明を使用して、分子の大きくて多様なライブラリー（たとえば官能基を導入、除去、または変えることによってターゲット分子を変える）を迅速且つ効率的に合成・分析評価することによって分子を最適化することができる。

本発明はさらに、組合せライブラリーの合成における各工程にて、反応混合物のアリコートサンプルの採取を可能にする。各アリコート中に存在する分子の構造を記録する。いったん薬理学的に活性の“ターゲット”分子が識別されたら、当業界によく知られているように、ターゲット分子の厳密な構造と組成を正確且つ迅速に確認することができる。

本発明の他の利点は、本発明は、手操作フォーマットおよび自動化フォーマットを含めた種々のフォーマットで実施できるということである。



(29)

特表平10-506379

本発明の可溶性組合せライブラリー中の分子はさらに、当業界によく知られているいかなる方法によっても精製することができる。これらの方法としては、沈殿、薄層クロマトグラフィー、カラムクロマトグラフィー、高圧液体クロマトグラフィー、結晶化、ゲル電気泳動、および濾過などがあるが、これらに限定されない。

PEGは、本発明の可溶性組合せライブラリーを得るための好ましい可溶性ポリマー化合物である。しかしながら、ポリビニルアルコールやポリビニルアミンとポリビニルピロリドンとの共重合体を含めた、他の化合物も使用することができる。

コア分子のある好ましいセットは、ラクタムチド分子のクラスを構成する。コア分子の他の好ましいセットは、天然および非天然のヌクレオチドを含めたジデオキシヌクレオチドのクラスを構成する。コア分子のさらに他の好ましいセットはアリールオキシ酢酸組成物を構成する。コア分子のさらに他の好ましいセットはポリエーテル組成物を構成する。コア分子のさらに他の好ましいセットはポリ酸素化アミノ酸のクラスを構成する。コア分子のさらに他の好ましいセットはアミノ酸組成物を構成する。コア分子のさらに他の好ましいセットはトリアジーンジオン組成物を構成する。コア分子のさらに他の好ましいセットは $\beta$ -遮断薬分子のクラスを構成する。コア分子のさらに他の好ましいセットはリコラミン核組成物を構成する。コア分子のさらに他の好ましいセットは $\beta$ -ラクタム組成物を構成する。コア分子のさらに他の好ましいセットはピリジル組成物を構成する。コア分子のさらに他の好ましいセットは $\alpha$ -アゼチド組成物を構成する。

#### 可溶性組合せライブラリーのスクリーニング

本発明の可溶性組合せライブラリーは、当業界によく知られているいかなる方法によってもスクリーニングすることができる。これらの方法としては、ELISAブレーティング法、受容体結合法、サザン法、ウェスタン法、ノザン法、および競合的結合法などがあるが、これらに限定されない。

結合する能力、および細胞受容体シグナルの形質導入経路を調節しうる能力に

(30)

特表平10-506379

関して試験すべき薬剤を識別するための1つの方法は以下のとおりである。本方法は、本発明の組合せライブラリーからの少なくとも1種の化合物を、細胞受容体 (cellular receptor) の官能部分を含んだタンパク質に、組合せライブラリー化合物が細胞受容体の官能部分に結合できるだけの十分な時間にわたって暴露す

る工程；結合していない化合物を除去する工程；および細胞受容体の官能部分に結合している化合物の存在を確認し、これによって細胞受容体シグナルの形質導入経路を調節する能力に関して試験すべき化合物を識別する工程；を含む。

このアプローチ（受容体結合分子の単離を行う）を使用する1つの方法は、組合せライブラリー分子またはその一部分を固体マトリックス〔たとえば、アガロースビーズもしくはプラスチックビーズ、マイクロタイター・ウェル (microtiter wells)、ペトリ皿、またはたとえばナイロンやニトロセルロースで造られた膜〕に結びつけること、およびこれらの結びついた組合せライブラリー分子を、組合せライブラリー分子結合化合物の存在下でインキュベーションすることを含む。前記固体支持体への結びつきは、直接であってもよいし、あるいは組合せライブラリー化合物に特異的な抗体によって固体支持体に結合していてもよい。インキュベーション後、結合していない化合物を洗い落とし、成分結合化合物を回収する。この方法を使用することによって、多くのタイプの分子を、受容体結合活性に関して同時にスクリーニングすることができる。

#### 特徴づけした化合物の投与

スクリーニング法によって可能性のある化合物を識別した後、識別された化合物を、それ単独で、あるいは識別された活性化合物とキャリアーもしくは賦形剤を含んだ医薬用組成物の形で患者に投与することができる。こうした化合物は、医薬用として許容しうる塩（すなわち、該化合物がその効果を発揮するのを妨げない無毒性の塩）として合成することができる。

本発明に使用するのに適した医薬用組成物としては、活性化合物がその意図する目的を達成するのに有効な量にて含まれているような組成物がある。この有効量の決定は、本明細書に記載の開示内容を考察すれば、当業者にとって可能であ

(31)

特表平10-506379

る。本発明の医薬用組成物は、それ自体公知の仕方で、たとえば従来のミキシング、溶解、粒状化、糖衣錠作製、糊状化、乳化、カプセル封入、エントラッピング (entrapping)、または凍結乾燥などの方法によって製造することができる。

経口使用のための医薬製剤は、たとえば、活性化合物と固体賦形剤とを混合し、得られた混合物を必要に応じて粉碎し、そして必要に応じて錠剤または糖衣コア

ーを得るための適切な補助剤を加えた後にグラニュール混合物を加工することによって得ることができる。適切な賦形剤としては、ラクトース、スクロース、マンニトール、またはソルビトールを含めた糖類；ならびに、たとえばトウモロコシスターチ、小麦スターチ、コメスターチ、ポテトスターチ、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、および/またはポリビニルピロリドン (PV P) 等のセルロース調製物；などがある。必要に応じて、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸、またはその塩（たとえばアルギン酸ナトリウム）などの崩壊剤 (disintegrating agent) を加えてもよい。

医薬用として許容しうる塩は、標準的な方法によって製造することができる。たとえば、先ず化合物の遊離塩基形を適切な溶媒（たとえば、適切な酸を含有した水溶液または水性アルコール溶液）に溶解させる。次いで、溶液を蒸発除去して塩を単離する。他の例では、有機溶媒中で遊離塩基と酸とを反応させることによって塩を製造する。

化合物の投与を容易にするために、たとえば化合物の溶解性を高めるために、キャリアーまたは賦形剤を使用することができる。キャリアーおよび賦形剤の例としては、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、種々の糖類もしくは種々のタイプのスターチ、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油、ポリエチレングリコール、および生理学的に相容性のある溶媒などがある。本発明の化合物または医薬用組成物は、静脈、腹膜、皮下、筋内、経口、または粘膜を含めた種々のルートによって投与することができる。

本発明の薬剤を、注入できるよう水溶液の形に、好ましくは生理学的に相容性

(32)

特表平10-506379

のある緩衝液の形（例えば生理学的食塩水緩衝液）に調製することができる。このような粘膜通過投与の場合、透過すべきバリアーに適した浸透剤（penetrant）を配合物中に使用する。このような浸透剤は、当業界において広く知られている。

医薬用として許容しうるキャリアーを使用して、本明細書に開示の化合物を系統的投与に適した調剤を作製することは、本発明の範囲内である。キャリアーと製造法を適切に選択すれば、本発明の組成物（特に溶液の形で配合したもの）を

非経口的に（たとえば静脈注射によって）投与することができる。本発明の化合物は、当業界によく知られている医薬用として許容しうるキャリアーを使用して、経口投与に適した調剤に容易に造り上げることができる。このようなキャリアーを使用することにより、治療すべき患者に対する経口投与用に、本発明の化合物をタブレット、ビル、カプセル、リキッド、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液、およびこれらの類似物として造り上げることができる。

非経口投与用の医薬製剤は、水溶性形態の活性化合物の水溶液を含む。さらに、活性化合物の懸濁液を適切なオイル状の注入懸濁液として調製することもできる。適切な親油性の溶媒またはビヒクルとしては、ゴマ油等の脂肪油、オレイン酸エチル等の合成脂肪酸エステル、トリグリセリド、またはリボソームなどがある。注射用水性懸濁液は、懸濁液の粘度を増大させる物質（たとえば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、またはデキストラン）を含有してもよい。必要に応じて、懸濁液はさらに、化合物の溶解性を増大させて高濃度溶液の調製を可能にする適切な安定剤または薬剤を含有してもよい。

細胞内投与用として調製された薬剤は、当業者によく知られている方法を使用して投与することができる。たとえば、このような薬剤は、リボソーム中にカプセル封入してから上記のように投与することができる。リボソームは、水性内部を有する球状脂質二層体である。リボソームの形成時に水溶液中に存在する分子はすべて、水性内部中に導入される。リボソーム内容物は外部の微環境から保護され、またリボソームが細胞膜と融合するので、細胞質中に効率的に供給される。

(33)

特表平10-506379

本明細書に記載の全ての特許および論文は、本発明が関係する当業者のレベルを示している。これらの全ての特許および論文参照のこと。また個々の特許および論文が引用している特許および論文も参照のこと。

当業者にとっては、本発明の範囲と精神を逸脱することなく、本発明の対する種々の置換形や変形が可能であることは言うまでもない。

#### 化学的定義

以下に、本発明の開示内容において使用されている用語の定義を幾つか説明する。

“アルキル”基とは、直鎖、枝分かれ鎖、および環状アルキル基を含めた飽和脂肪族炭化水素基を表している。アルキル基は1～12個の炭素を有していてもよいし、あるいは3～9個の炭素を有していてもよい。アルキル基は、置換されていても非置換でもよい。置換されている場合、置換基は、ヒドロキシル、シアノ、アルコキシ、=O、=S、NO<sub>2</sub>、N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、アミノ、SH、またはアリールであってよい。

“アルケニル”基とは、直鎖、枝分かれ鎖、および環状基を含めた、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を有する不飽和炭化水素基を表している。アルケニル基は1～12個の炭素を有していてもよいし、あるいは3～9個の炭素を有していてもよい。アルケニル基は、置換されていても非置換でもよい。置換されている場合、置換基は、ヒドロキシル、シアノ、アルコキシ、=O、=S、NO<sub>2</sub>、N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、アミノ、SH、またはアリールであってよい。

“アルキニル”基とは、直鎖、枝分かれ鎖、および環状基を含めた、少なくとも1つの炭素-炭素三重結合を有する不飽和炭化水素基を表している。アルキニル基は1～12個の炭素を有していてもよいし、あるいは3～9個の炭素を有していてもよい。アルケニル基は、置換されていても非置換でもよい。置換されている場合、置換基は、ヒドロキシル、シアノ、アルコキシ、=O、=S、NO<sub>2</sub>、N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、アミノ、SH、またはアリールであってよい。

“アルコキシ”基とは、“-O-アルキル”基を表しており、このとき“アルキル”は上記にて定義したとおりである。

(34)

特表平10-506379

“アリール”基とは、共役  $\pi$  電子系 (conjugated  $\pi$  electron system) を有する少なくとも1つの環をもった芳香族基を表しており、炭素環式アリール基、複素環式アリール基、およびビアリール基を含み、これらはいずれも必要に応じて置換されていてもよい。アリール基の置換基は、ヒドロキシル、シアノ、アルコキシ、アルキル、アルケニル、アルキニル、アミノ、またはアリールであつてよい。

アルキルアリール基とは、アルキル基 (前述) がアリール基 (前述) に共有結合している形の基を表している。

炭素環式アリール基とは、芳香環上の環原子が炭素原子であるような基を表している。炭素原子は、必要に応じて置換されていてもよい。炭素環式アリール基は、単環の炭素環式アリール基および必要に応じて置換されたナフチル基を含む。

複素環式アリール基は、1～3個のヘテロ原子を芳香環中の環原子として有し、環原子の残りが炭素原子であるような基である。適切なヘテロ原子としては、酸素、イオウ、および窒素などがあり、そして複素環式アリール基としては、フラニル、チエニル、ビリジル、ピロリル、N-低級アルキル、ピロロ、ビリミジル、ピラジニル、およびイミダゾリルなどがあり、これらはいずれも必要に応じて置換されていてもよい。

“カルボアルコキシ (carbalkoxy)” 基とは  $\text{COOX}$  基を表しており、このとき“X”は低級アルキル基である。

“低級”とは、有機基または有機化合物に関して述べており、それぞれ最大7個までの炭素原子を有し、1つまたは2つの炭素原子を含んでいてもよい。このような基は、直鎖であっても枝分かれ鎖であってもよい。

複素環式アリール基は、1～3個のヘテロ原子を芳香環中の環原子として有し、環原子の残りが炭素原子であるような基である。ヘテロ原子としては、酸素、イオウ、および窒素などがあり、そして複素環式アリール基としては、フラニル、チエニル、ビリジル、ピロリル、N-低級アルキル、ピロロ、ビリミジル、ピラジニル、およびイミダゾリルなどがあり、これらはいずれも必要に応じて置換

(35)

特表平10-506379

されていてもよい。

“アミド”とは $\text{-C(O)-NH-R}$ を表しており、このときRはアルキル、アリール、アルキルアリール、または水素であってよい。

“チオアミド”とは $\text{-C(S)-NH-R}$ を表しており、このときRはアルキル、アリール、アルキルアリール、または水素であってよい。

“エステル”とは $\text{-C(O)-OR'}$ を表しており、このときR'はアルキル、アリール、またはアルキルアリールであってよい。

“アミン”とは $\text{-N(R'')R'''}$ を表しており、このときR''とR'''は独立的に水素、アルキル、アリール、またはアルキルアリールであってよい。

チオエーテルとは $\text{R-S-R}$ を表しており、このときRはアルキル、アリール、またはアルキルアリールである。

エーテルとは $\text{R-O-R}$ を表しており、このときRはアルキル、アリール、またはアルキルアリールである。

本発明を理解しやすくするために、幾つかの特定のコア分子の可溶性組合せライブラリーについて以下に説明する。本発明は下記の実施例によって限定されることはなく、当業者であれば考え得るような、未だ明らかにされていないか又は後で開発されるであろう本発明の変形も、請求の範囲に記載の本発明の範囲内であることは言うまでもない。

#### 実施例 1

##### $\beta$ -遮断薬組成物の可溶性組合せライブラリー

$\beta$ -遮断薬組成物を含んだ組成物および化合物は、診断用および/または医療用に使用できる薬理学的に有用な化合物をスクリーニングするのに有効である。本発明により、多様で多くのセットの $\beta$ -遮断薬組成物の合成およびスクリーニングが可能となる。したがって、薬理学的に活性である新規の効果的な $\beta$ -遮断薬組成物は、従来の方法より本発明の方法によってより迅速且つ効率的に識別することができる。 $\beta$ -遮断薬組成物の可溶性組合せライブラリーの特に重要な用途は、自律神経系に影響を及ぼす新規の有効な薬物を開発することにある。

本発明を使用しての $\beta$ -遮断薬組成物の合成は、基本的には2つの工程を含ん

(36)

特表平10-506379

だ単純且つ効率的なプロセスである。それにもかかわらず、実質的に無限の多様性を合成プロセス中に簡単且つ速やかに導入することができ、多数の多様な $\beta$ -遮断薬分子が高収率で得られる。

1つの合成スキームにおいては、フェノール類1（例えばナフトール）をエピクロロヒドリンで処理する。図1を参照のこと。こうして得られる化合物2をアミン3で処理して、例えば $\beta$ -遮断薬であるプロプラノロールを生成させる。

本発明は、これら $\beta$ -遮断薬の大きなセットの速やかな合成を可能にする。この合成の第一段階においては、別個の溶液の形の15種のフェノール類をエピクロロヒドリンと反応させる。フェノール類の $R_1$ 基は、アルキル、アルケニル、アル

キニル、アルコキシ、アリール、アルキルアリール、カルボキシリックアリール、複素環式アリール、カルボアルコキシ、複素環式アリール、アミド、チオアミド、エステル、アミン、またはチオエーテルのうちの1つ以上であってよい。図1に示されている $m$ は1～4の範囲である。フェノール類は、1つ以上の $R_1$ 基を有していてもよい。同様に、フェノール類の $R_2$ 基は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アリール、アルキルアリール、カルボキシリックアリール、複素環式アリール、カルボアルコキシ、複素環式アリール、アミド、チオアミド、エステル、アミン、またはチオエーテルのうちの1つ以上であってよい。図1に示されている $n$ は1～4の範囲である。

次いでこれらの溶液15種すべてをブールし、15種のアミンと速やかに反応させて、225種の $\beta$ -遮断薬を迅速且つ簡単に生成させる。アミン3は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アリール、アルキルアリール、カルボキシリックアリール、複素環式アリール、カルボアルコキシ、または複素環式アリールのうちの1つである $R_3$ 基を有する。同様に、アミンの $R_4$ は、アルキル、アルケニル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アリール、アルキルアリール、カルボキシリックアリール、複素環式アリール、カルボアルコキシ、または複素環式アリールのうちの1つである。これらの $\beta$ -遮断薬は、速やかに分析評価および特性決定を行うことができる。



(37)

特表平10-506379

実施例 2 $\gamma$ -ラクタムチド組成物の可溶性組合せライブラリー

$\gamma$ -ラクタムチド組成物の可溶性組合せライブラリーは、診断用および/または治療用に使用することのできる薬理的に有用な化合物をスクリーニングするのに役立つ。好ましい使い方は、天然に産するペプチドの活性によく似た活性を示す分子を見いだすために、 $\gamma$ -ラクタムチド組成物のライブラリーを使用することである。

$\gamma$ -ラクタムチド組成物の可溶性組合せライブラリーに対する合成スキームの1つの例は以下のとおりである。メチオニン（アミノ末端が保護されている）とアミノ酸 4 とを反応させ、EDCで処理し、次いでMEIで処理する。図2を参

照のこと。メチオニン保護基は、ペプチドまたは他のターゲット分子中にラクタムを導入できるものであれば、当業界に公知のいかなるタイプの基でもよい。例えば、保護基はt-Bocであってもよい。アミノ酸のR基の例としては、水素、 $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $\text{CH}_2\text{Ph}$ 、 $\text{CH}_2$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-NHCBz}$ 、あるいはアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アリール、アルキルアリール、カルボキシリックアリール、複素環式アリール、カルボアルコキシ、複素環式アリール、アミド、チオアミド、エステル、アミン、またはチオエーテルのうちの1つなどがある。アミノ酸のR基はさらに、天然アミノ酸のもつR基のうちの1つでもよい。

こうして得られる生成物をヨウ化メチルで処理し、インターアルキル化 (interalkylation) を起こさせ、5員環を有するラクタムを形成させる。次いで、この化合物を可溶性ポリマーのアミノ末端と反応させる。生成物7のアミノ末端からt-Bocブロッキング基を開裂させる。

次いで、保護基をはずした化合物をさらなるラクタムと反応させて、 $\gamma$ -ラクタムチドを形成させる。さらなるラクタム5のR'基の例としては、水素、 $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $\text{CH}_2\text{Ph}$ 、 $\text{CH}_2$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-NHCBz}$ 、あるいはアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アリール、アルキルアリール、カルボキシリックアリール、複素環式アリール、カルボアルコキシ、複素環

(38)

特表平10-506379

式アリール、アミド、チオアミド、エステル、アミン、またはチオエーテルのうちの1つなどがある。5のR<sup>''</sup>基はさらに、天然アミノ酸のもつR基のうちの1つであつてもよい。

### 実施例 3

#### δ-ラクタムチオチド組成物の可溶性組合せライブラリー

δ-ラクタムチオチド組成物の可溶性組合せライブラリーは、診断用および/または治療用に使用することのできる薬理学的に有用な化合物をスクリーニングするのに役立つ。

本発明を使用した本ライブラリーの1つの可能な合成法は次の通りである。保護処理したシステイン8をアミノ酸エステル9と反応させ、先ずEDCで処理し

次いでヒドロキシド(OH<sup>-</sup>)で処理する。図3を参照のこと。アミノ酸エステルのR<sup>'</sup>は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アリール、アルキルアリール、カルボキシリックアリール、複素環式アリール、カルボアルコキシ、複素環式アリール、アミド、チオアミド、エステル、アミン、またはチオエーテルのうちの1つであつてよい。9のR<sup>'</sup>基はさらに、天然アミノ酸のもつR基のうちの1つであつてもよい。アミノ酸エステル9のR<sup>''</sup>基は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アリール、またはアルキルアリールのうちの1つであつてよい。

こうして得られる化合物に、5員環ラクタム11に環化させるために(CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>とTsDHを加える。ラクタム11を、可溶性ポリマー化合物のアミノ末端と反応させる。結合ラクタム12を脱保護処理する。すなわち、保護基を12のアミノ末端から開裂させる。次いで、脱保護処理した12を未結合のラクタム13と反応させる。未結合ラクタム13のR<sup>'''</sup>基は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アリール、アルキルアリール、カルボキシリックアリール、複素環式アリール、カルボアルコキシ、複素環式アリール、アミド、チオアミド、エステル、アミン、またはチオエーテルのうちの1つであつてよい。13のR<sup>'''</sup>基はさらに、天然アミノ酸のもつR基のうちの1つであつてもよい。こうして得られる反応

(39)

特表平10-506379

生成物は結合した $\delta$ -ラクタムチオチド13であり、拘束されたペプチド様 (a constrained peptidomimetic) である。

#### 実施例 4

##### $\gamma$ -ラクタムペプチド組成物の可溶性組合せライブラリー

$\delta$ -ラクタムペプチド組成物の可溶性組合せライブラリーは、診断用または治療用またはその両方に使用することのできる薬理学的に有用な化合物をスクリーニングするのに役立つ。例えば、 $\gamma$ -ラクタムペプチド組成物の可溶性組合せライブラリーは、天然に存在するペプチドの生物学的活性と同じかあるいはそれより高い生物学的活性を示すペプチド類縁体を開発するのに有用である。

図4を参照のこと。R(CH<sub>2</sub>=O)CH<sub>2</sub>OH<sup>14</sup>をH<sub>2</sub>S、Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、および化合物<sup>15</sup>で処理する。Rはアルキル基、アリール基、またはアルキルアリール基である。

こうして得られる化合物を酸(H<sup>+</sup>)で処理し、BF<sub>3</sub>の存在下で化合物<sup>16</sup>と反応させる。こうして得られる化合物を(EtO)<sub>2</sub>POCH<sub>2</sub>COOEtと反応させ、還元し、そして水酸化物で処理して化合物<sup>17a</sup>を生成させる。化合物<sup>17a</sup>を化合物<sup>17b</sup>およびEDCと反応させて化合物<sup>17c</sup>を生成させる。Et<sub>3</sub>Nの存在下で化合物<sup>17c</sup>とBu<sub>2</sub>BOHとを反応させて化合物<sup>17d</sup>を生成させる。化合物<sup>17d</sup>をNBDで処理して化合物<sup>17e</sup>を生成させる。化合物<sup>17e</sup>をN<sub>3</sub>と反応させ、LiOHと反応させ、次いで還元剤で処理して化合物<sup>17f</sup>を生成させる。化合物<sup>17f</sup>を先ずフタルイミドで処理し、次いでCF<sub>3</sub>COOHで処理し、次いでアミノ酸で処理し、次いでMeIで処理して化合物<sup>17g</sup>を生成させる。アミノ酸のR'基は、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アリール、アルキルアリール、カルボキシリックアリール、複素環式アリール、アミド、チオアミド、エステル、アミン、またはチオエーテルでよい。さらにアミノ酸のR''基は、天然アミノ酸が有するR基のうちの1つでもよい。次いで化合物<sup>17g</sup>をNaHで処理して環化を起こさせ、 $\gamma$ -ラクタムペプチド<sup>18</sup>を生成させる。次いでこの $\gamma$ -ラクタムペプチドを可溶性ポリマー支持体に結合させることができる。結合した $\gamma$ -ラクタムペプチドに対し化学的変性を施すことができる。さらに、

(40)

特表平10-506379

他の $\gamma$ -ラクタムペプチド、アミノ酸、またはアミノ酸類縁体を加えることによって、結合した $\gamma$ -ラクタムペプチドを延ばすことができる。

#### 実施例 5

##### アリールオキシ酢酸組成物の組合せライブラリー

アリールオキシ酢酸組成物の組合せライブラリーは、医学的、薬理的、および科学的研究の分野において広い用途を有している。特に、アテローム性動脈硬化症受容体を目標とする新薬をスクリーニングするのに使用することができる。アリールオキシ酢酸組成物はさらに、トリグリセリドのレベルを低下させる有効な新薬をスクリーニングするのに有用である。

アリールオキシ酢酸組成物の組合せライブラリーの1つの可能な一段階合成においては、置換フェノール<sup>19</sup>とケトンまたはアルデヒドとを、塩基の存在下にて適切な溶媒中で反応させる。図5を参照のこと。塩基はNaOH、溶媒は塩化メ

チレンである。置換フェノール<sup>19</sup>は、オルト、メタ、またはパラ位のいずれが置換されていてもよいし、あるいはこれらの位置の組合せの形で置換されていてもよい。<sup>19</sup>のX基は、ヒドロキシル、ハロゲン、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アリール、アルキルアリール、カルボキシリックアリール、複素環式アリール、カルボアルコキシ、複素環式アリール、アミド、チオアミド、エステル、アミン、チオエーテル、または縮合体 (fused) のうちの1つであってよい。置換フェノール<sup>19</sup>は複数のX基を有していてもよい。化合物<sup>20</sup>のR<sub>1</sub>基は水素であってもよく、あるいはアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アリール、およびアルキルアリールのうちの1つであってもよい。同様に、化合物<sup>20</sup>のR<sub>2</sub>基は水素であってもよいし、あるいはアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アリール、およびアルキルアリールのうちの1つであってもよい。ギルマンとワイルダー (1955) による文献を参照のこと。こうして得られる化合物はアリールオキシ酢酸<sup>21</sup>である。

#### 実施例 6

##### ポリエーテル主鎖組成物の可溶性組合せライブラリー

ポリエーテル主鎖組成物の組合せライブラリーは、診断用および/または治療

(41)

特表平10-506379

用に使用することのできる、薬理的に有用な化合物をスクリーニングするのに役立つ。特に、ポリエーテル主鎖組成物は、患者の細胞膜を横切るのを可能にするような親油性を有しているものがある。

図6を参照のこと。化合物22をビニル化合物A、B、及びCからなる群から選ばれるビニル化合物でエステル化する。化合物A、B、及びCのnは種々の値をとることができ、ゼロより大きい整数である。反応により化合物23が得られる。化合物23を $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ で処理し、A、B、およびCからなる群から選ばれるビニル化合物と反応させる。化合物A、B、及びCのnは種々の値をとることができ、ゼロより大きい整数である。所望のサイズのポリエーテル化合物が生成されるまで、 $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ による処理と、A、B、およびCからなる群から選ばれるビニル化合物との反応を繰り返す。

#### 実施例7

##### ポリ酸素化組成物の可溶性組合せライブラリー

ポリ酸素化組成物の可溶性組合せライブラリーは、診断用または治療用、あるいはその両方用に使用することのできる、薬理的に有用な化合物をスクリーニングするのに役立つ。

ポリ酸素化アミノ酸の可溶性組合せライブラリーは、以下のように合成することができる。図7を参照のこと。マンニトールと化合物24との縮合は、適切な溶媒中で行われる。マンニトールは、d-マンニトールであっても、l-マンニトールであってもよい。d-マンニトールのほうが好ましい形態である。化合物24のR<sub>1</sub>基とR<sub>2</sub>基は、アルキルまたはアルキルアリーのいかなる組合せであってもよい。化合物24のR<sub>1</sub>基とR<sub>2</sub>基は、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アリール、またはアルキルアリーのいかなる組合せであってもよい。ジメトキシケタールが化合物24の好ましい形態である。溶媒は、ジメチルホルムアミドおよびCSAである。こうして得られるジオール25を過ヨウ素酸化( $\text{KIO}_4$ および $\text{KHCO}_3$ )により開裂して、高度に酸素化されたアルデヒド26を形成させる。アルキリデン保護されたグリセルアルデヒドは当業界によく知られており、シュミットとブラッドレーによる“Synthesis(1992)”およびシュミ

(42)

特表平10-506379

ットらによる "J. Org. Chem(1992)" 等の文献中に報告されている (これらの文献を参照のこと)。ケタール化されたグリセルアルデヒド27とジアルキルホスフィニル化合物との凝縮により、アミノエステル28が得られる。このアミノエステルを水素化し、次いで水酸化カリウムで処理して高度に酸素化されたアミノ酸を生成させる。たとえばFmocを使用してアミノ酸のアミノ末端を保護する。

ポリ酸素化アミノ酸の可溶性組合せライブラリーは次のように合成することができる。図8を参照のこと。ゾラー (Zoller) とベン・アイシャイ (Ben-Ishai) による "Tetrahedron 1975" およびシュミットらによる "Synthesis 1984" を参照のこと。グリオキサル29と化合物30とを反応させて化合物31を生成させる。次いで化合物31を、適切な溶媒中にて酸で処理する。溶媒はメタノールでよい。こうして得られる化合物32とP(OMe)<sub>3</sub>とを反応させて、化合物33を生成させる。

化合物33をKOtBuと反応させ、次いで化合物34と反応させてデヒドロアミノエステル35を形成させる。化合物34のR'基およびR''基は、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アリール、およびアルキルアリのールの組合せであってよい。このエステルを水素化し、次いで塩基で処理して高度に酸素化されたアミノ酸36を生成させる。塩基は水酸化カリウムでよい。次いで、たとえばFmocを使用して、高度に酸素化されたアミノ酸36のアミノ末端を保護することができる。

高度に酸素化されたアミノ酸からのポリ酸素化ライブラリーの合成は、次のように行うことができる。図9を参照のこと。高度に酸素化されたアミノ酸Aを可溶性ポリマー化合物のアミノ末端に結合させる。結合アミノ酸44を脱保護処理し、次いでさらなる高度酸素化アミノ酸と反応させる。所望数のアミノ酸を有するペプチド主鎖が生成されるまで、さらなる高度酸素化アミノ酸を加える。

#### 実施例 8

##### トリアジーン-ジオン組成物の可溶性組合せライブラリー

トリアジーン-ジオン組成物の可溶性組合せライブラリーは、診断用または治療用あるいはその両方用に使用することのできる、薬理的に有用な化合物をスク

(43)

特表平10-506379

リーニングするのに役立つ。

図10を参照のこと。化合物45を可溶性ポリマー化合物に結合させる。こうして得られる化合物46と化合物47とを反応させて、化合物48を生成させる。化合物48と $\text{NH}_2\text{-NH}_2$ とを反応させる。こうして得られる化合物49を化合物50と反応させて、化合物51を生成させる。化合物50の $\text{R}_1$ 基と $\text{R}_2$ 基は、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アリール、およびアルキルアリエルのいかなる組合せであってもよい。次いで化合物51と化合物53とを反応させる。化合物53は、化合物52をホスゲンで処理することによって簡単に得られる。化合物52の $\text{R}'$ 基は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アリール、アルキルアリエル、カルボキシリックアリール、複素環式アリール、カルボアルコキシ、複素環式アリール、アミド、チオアミド、エステル、アミン、またはチオエーテルであってよい。化合物52の $\text{R}'$ 基はさらに、天然アミノ酸の有する $\text{R}$ 基のうちの

1つであってもよい。化合物51と53との間の反応により、化合物54が得られる。次いで化合物54を酸で処理して、1,2,3-トリアジン-3,6-ジオン55を生成させる。

#### 実施例 9

##### ジデオキシヌクレオチド組成物の可溶性組合せライブラリー

ジデオキシヌクレオチドの可溶性組合せライブラリーは、診断用または治療用あるいはその両方用に使用することのできる、薬理的に有用な化合物をスクリーニングするのに役立つ。例えば、本発明によって得られるジデオキシヌクレオチドは、遺伝子ベクター、遺伝子治療、およびゲルアッセイ等に使おうとするジデオキシヌクレオチドの大きくて多様なセットを生成させてスクリーニングするのに使用することができる。

チェン (Chen) らによる "The Journal of Organic Chemistry(1991)"、および図11を参照のこと。溶媒はジメチルホルムアミドとジオキサンであり、70℃の温度にて使用する。化合物60の好ましい形態の固相は、ポリスチレン、テンタゲル (tentagel)、およびコントロール・ポア・ガラス (control pore glass)

(44)

特表平10-506379

である。固相の代わりに、可溶性ポリマー化合物を使用してもよい。化合物60のBはジデオキシヌクレオチド塩基でよく、たとえばアデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル、あるいは非天然のプリンもしくはピリミジン複素環式化合物などがある。次いで、生成物61と求核剤とを反応させる。求核剤は、アミノ酸、糖類、小さな分子（たとえば $\text{N}_3$ や $\text{NaI}$ などがあるが、これらに限定されない）、 $\text{OR}$ 、 $\text{SR}$ 、 $\text{NR}_1\text{R}_2$ 、 $\text{CN}$ 、アルキル、 $\text{N}_3$ 、ハライド、リン酸エステル、または硫酸エステルなどでよい。R、 $\text{R}_1$ 、および $\text{R}_2$ 基は、アルキル、アリール、アシル、ホスフェート、またはサルフェートでよい。

こうして得られる生成物62を $\text{CF}_3\text{SO}_2\text{Cl}$ で処理し、求核剤 $\text{Nu}'$ と反応させ、次いでビーズから開裂して化合物63を生成させる。求核剤 $\text{Nu}'$ は、アミノ酸、糖類、小さな分子（たとえば $\text{N}_3$ や $\text{NaI}$ などがあるが、これらに限定されない）、 $\text{OR}$ 、 $\text{SR}$ 、 $\text{NR}_1\text{R}_2$ 、 $\text{CN}$ 、アルキル、 $\text{N}_3$ 、ハライド、リン酸エステル、または硫酸エステルなどでよい。R、 $\text{R}_1$ 、および $\text{R}_2$ 基は、アルキル、アリール、アシル、ホスフェート、またはサルフェートでよい。

さらに、化合物62の $2'\text{-OH}$ をキャップし、次いでビーズから開裂して化合物64を生成させることもできる。

#### 実施例10

##### リコラミン様核組成物の可溶性組合せライブラリー

リコラミン様核組成物の可溶性組合せライブラリーは、医学的、薬理的、および科学研究を含めた多くの重要な研究作業にとって有用である。たとえば、リコラミン様核組成物の可溶性組合せライブラリーは、抗菌剤、鎮痛薬、および幻覚剤として有用である。

図12を参照のこと。化合物70と化合物71（レジンまたは可溶性ポリマー化合物に結合していてもよい）とを反応させて、化合物72を生成させる。化合物70は置換されていてもよい。R'基とR''基は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アリール、アルキルアリール、カルボキシリックアリール、複素環式アリール、カルボアルコキシ、複素環式アリール、アミド、チオアミド、エステル、アミン、またはチオエステルのいかなる組合せであってよい。xは1、2



(45)

特表平10-506379

、または3である。yは1または2である。次いで化合物72のレジンを開裂させて、化合物73(リコラミン様核)を生成させる。

#### 実施例11

##### $\beta$ -ラクタム組成物の可溶性組合せライブラリー

$\beta$ -ラクタム組成物の可溶性組合せライブラリーは、医学的、薬理的、および科学的研究作業において有用である。

$\beta$ -ラクタム組成物の可溶性組合せライブラリー(図13)は、化合物75または76のカルボキシル末端を可溶性ポリマー支持体に結びつけることによって簡単に合成できる。次いで、化合物75または76のアミノ末端を、アミノ酸、カルバメート、アミド、チオアミド、エステル、アミン、またはチオエステルと反応させる。

#### 実施例12A

##### $\alpha$ -アゼチド組成物の可溶性組合せライブラリー

$\alpha$ -アゼチド組成物の可溶性組合せライブラリーは、医学的、薬理的、および医学的研究に有用である。たとえば、 $\alpha$ -アブペプチドの可溶性組合せライブ

ラリーは、ヒトの白血球のエラスターゼ、豚の膵臓のエラスターゼ、キモトリプシン様の酵素、およびシステインプロテアーゼを含めた、数多くの酵素の抑制剤および活性部位滴定剤として有用である。 $\alpha$ -アゼチドライブラリーはさらに、ノロフタルミン酸アミド(norophthalmic acid amide)の類縁体としても有用である。

$\alpha$ -アザアミノ酸組成物の可溶性組合せライブラリーの合成例が図14に示されている。カルバゼート(carbazate)(化合物95)と化合物96とを反応させて化合物97を生成させる。化合物96の $R_2$ は水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アリール、またはアルキルアリールであってよい。化合物96の $R_1$ はアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アリール、またはアルキルアリールであってよい。化合物97を $NaBH_3CN$ 及び酸と反応させて、化合物98を生成させる。化合物98と化合物99とを反応させて、化合物100を生成させる。化合物100を $MeI$ と、次いでモルホリンと反応させて、化合物101(アザアミノ

(46)

特表平10-506379

酸)を生成させる。これとは別に、化合物100を求核剤と反応させる。得られた化合物をMeIと、次いでモルホリンと反応させて、化合物102(アザアミノ酸)を生成させる。

別の合成スキーム(図15)では、化合物103と化合物104とを反応させて、化合物106を生成させる。化合物104のリンカーは、脂肪族基(たとえば、アセトアルデヒドやシクロヘキサンカルボキサルデヒド等のアルデヒド、ケトン、またはメタクロレイン);芳香族基(たとえば、フェニルアセトアルデヒド、フルフラール、2,4,6-トリメトキシベンズアルデヒド、またはピペロナール);あるいは帯電化合物(たとえば、5-ホルミル-2-フランスルホン酸またはピリジン-2-カルボキサルデヒド-N-オキシド)であってよい。化合物106を脱保護処理して化合物107を生成させる。次いで、化合物107と活性化されたアザアミノ酸エステル(化合物108)とを反応させて化合物109を生成させる(ステップ<sup>\*</sup>)。化合物108は、カルバゼート(化合物103)と化合物105とを反応させることにより容易に得られる。化合物109を脱保護処理し、アザペプチドの鎖が所望の長さに延びるまでステップ<sup>\*</sup>を繰り返す。

### 実施例12B

#### $\alpha$ -アゼチド組成物の組合せライブラリーの製造法

化合物501の製造: ビスベンタフルオロフェノールカーボネートの合成  
(化合物501の構造を図36に示す)

ベンタフルオロフェノール(0.27モル, アルドリッチケミカル社から市販)を0.5モラー(Molar)のKOH中に溶解し、0℃に冷却した。激しく攪拌しながら、溶液中にホスゲンを通した。反応混合物のpHを6.0以上になるよう調節した。ときにははカーボネートが溶液から結晶化するが、大抵の場合は油状の沈殿物が生じる。反応混合物を0℃で一晩静置した。固化した残留物を濾過し、水で洗浄し、クロロホルム中に溶解した。無水硫酸ナトリウムで溶液を乾燥し、濾過し、そして溶媒を蒸発除去した。粗製結晶質生成物(不純物のために、強いクロロホルム様の臭気を有する)をヘキサンから再結晶した。55gのベンタフルオロフェノールで始めて、収率は約75%であった。

(47)

特表平10-506379

化合物502の製造 (化合物502の構造を図36に示す)

0.51モルの85%ヒドラジン水和物 (アルドリッチ社から市販) を2.55モラー (2.55 Molar) のエタノール中に溶解して得られる溶液を還流しておき、これに0.098モルの塩化ベンジルを0.98モラーのエタノール中に溶解して得られる溶液を1時間で加えた。還流6時間後、アルコールを蒸留によって除去した。残留物をエーテルで抽出し、エーテル抽出液を炭酸カリウムで乾燥し、濾過した。次いで0.1モラーの塩化メチレン中にて、この粗製塩基 (1.0当量) を1.1当量のジ-tert-ブチルジカーボネート (アルドリッチ社から市販) にさらし、25℃で一晩攪拌した。蒸留により溶媒を除去し、残留物をエーテルで抽出し、水で洗浄し (1X)、炭酸カリウムで乾燥し、濾過した。塩化メチレン：エーテル/石油エーテル勾配を使用したフラッシュクロマトグラフィーによって生成物を精製することができる。

化合物503の製造 (化合物503の構造を図36に示す)

85%ヒドラジン水和物 (10当量, アルドリッチ社から市販) を2.55モラーのエタノール中に溶解して得られる溶液を1.0当量のジ-tert-ブチルジカーボネート (アルドリッチ社から市販) にさらし、25℃で一晩攪拌した。蒸留により溶媒を

除去し、残留物をエーテルで抽出し、水で洗浄し (1X)、炭酸カリウムで乾燥し、そして濾過した。塩化メチレン：エーテル/石油エーテル勾配を使用したフラッシュクロマトグラフィーによって生成物を精製することができる。

化合物504の製造 (化合物504の構造を図37に示す)

1.0当量の臭化p-ヒドロキシベンジルを塩化メチレン中に溶解して得られる溶液に、1.1当量の60%水素化ナトリウムを0℃で加え、1時間攪拌した。1.1当量の臭化ベンジルを加え、混合物を一晩攪拌した。次いで混合物を水で冷却し、エーテルで希釈し、蒸留によって精製した。0.51モルの85%ヒドラジン水和物 (アルドリッチ社から市販) を2.55モラーのエタノール中に溶解して得られる溶液を還流しておき、これに1.0当量の本化合物を1時間で加えた。還流6時間後、アルコールを蒸留によって除去した。残留物をエーテルで抽出し、エーテル抽出液を炭酸カリウムで乾燥し、そして濾過した。次いで0.1モラーの塩化メチレン中

(48)

特表平10-506379

にて、この粗製塩基 (1.0当量) を1.1当量のジ-tert-ブチルジカーボネート (アルドリッチ社から市販) にさらし、25℃で一晩撹拌した。蒸留により溶媒を除去し、残留物をエーテルで抽出し、水で洗浄し (1X)、炭酸カリウムで乾燥し、そして濾過した。塩化メチレン：エーテル/石油エーテル勾配を使用したフラッシュクロマトグラフィーによって生成物を精製することができる。

化合物505の製造 (化合物505の構造を図37に示す)

0.51モルの85%ヒドラジン水和物 (アルドリッチ社から市販) を2.55モラーのエタノール中に溶解して得られる溶液を還流しておき、これに0.098モルのヨウ化メチルを0.98モラーのエタノール中に溶解して得られる溶液を1時間に加えた。還流6時間後、アルコールを蒸留によって除去した。残留物をエーテルで抽出し、エーテル抽出液を炭酸カリウムで乾燥し、そして濾過した。次いで0.1モラーの塩化メチレン中にて、この粗製塩基 (1.0当量) を1.1当量のジ-tert-ブチルジカーボネート (アルドリッチ社から市販) にさらし、25℃で一晩撹拌した。溶媒をエーテルで抽出し、水で洗浄し (1X)、炭酸カリウムで乾燥し、そして濾過した。塩化メチレン：エーテル/石油エーテル勾配を使用したフラッシュクロマトグラフィーによって生成物を精製することができる。

化合物506の製造 (化合物506の構造を図37に示す)

0.51モルの85%ヒドラジン水和物 (アルドリッチ社から市販) を2.55モラーのエタノール中に溶解して得られる溶液を還流しておき、これに0.098モルの2-クロロプロパンを0.98モラーのエタノール中に溶解して得られる溶液を1時間に加えた。還流6時間後、アルコールを蒸留によって除去した。残留物をエーテルで抽出し、エーテル抽出液を炭酸カリウムで乾燥し、そして濾過した。次いで0.1モラーの塩化メチレン中にて、この粗製塩基 (1.0当量) を1.1当量のジ-tert-ブチルジカーボネート (アルドリッチ社から市販) にさらし、25℃で一晩撹拌した。蒸留により溶媒を除去し、残留物をエーテルで抽出し、水で洗浄し (1X)、炭酸カリウムで乾燥し、そして濾過した。塩化メチレン：エーテル/石油エーテル勾配を使用したフラッシュクロマトグラフィーによって生成物を精製することができる。

(49)

特表平10-506379

化合物507の製造 (化合物507の構造を図38に示す)

0.51モルの85%ヒドラジン水和物 (アルドリッチ社から市販) を2.55モラーのエタノール中に溶解して得られる溶液を還流しておき、これに0.098モルの1-ブロモ-2-メチルプロパンを0.98モラーのエタノール中に溶解して得られる溶液を1時間に加えた。還流6時間後、アルコールを蒸留によって除去した。残留物をエーテルで抽出し、エーテル抽出液を炭酸カリウムで乾燥し、そして濾過した。次いで0.1モラーの塩化メチレン中にて、この粗製塩基 (1.0当量) を1.1当量のジ-tert-ブチルジカーボネート (アルドリッチ社から市販) にさらし、25℃で一晩撹拌した。蒸留により溶媒を除去し、残留物をエーテルで抽出し、水で洗浄し (1X)、炭酸カリウムで乾燥し、そして濾過した。塩化メチレン：エーテル/石油エーテル勾配を使用したフラッシュクロマトグラフィーによって生成物を精製することができる。

化合物508の製造 (化合物508の構造を図38に示す)

アザジペプチド (化合物508, 見出し番号1~7, 図38) の合成に対する一般化された手順は以下の通りである。化合物501、ビスペンタフルオロフェノールカーボネート (1.1当量)、および1.1当量のジメチルアミノピリジン (DMA P) を

0.10モラーの塩化メチレン中に溶解して得られる溶液に、1.0当量のアルキル/アリールヒドラジン (化合物502~507、図36, 37, および38) を、シリンジポンプを介して30~40分で滴下する。滴下完了後、反応混合物を別の1.1当量のジメチルアミノピリジン (DMA P) にさらし、別の1.0当量のアルキル/アリールヒドラジン (化合物502~507、図36, 37, および38) を一度に加える。24時間後、反応混合物をから全ての溶媒を蒸発除去する。この粗製物をできるだけ少量の塩化メチレン中に再び懸濁させ、塩化メチレン：エーテル勾配 (9:1) にてフラッシュクロマトグラフィーにより精製する。一般的な収率は約85%である。得られる収率 (粗収率) に関しては図38のチャートを参照のこと。

化合物509の製造 (化合物509の構造を図39に示す)

メチル4-(ヒドロキシメチル)ベンゾエート (2.0g, 12ミリモル, 1.0当量, ア

(50)

特表平10-506379

ルドリッチ社から市販)を0.10モラーのジエチルエーテル中に溶解して得られた溶液に、8 mlのイソブチレン(2-メチルプロペン、アルドリッチ社から市販)を $-78^{\circ}\text{C}$ にて吹き込んだ。次いで10滴の硫酸を加え、本混合物を一晩攪拌した。反応混合物をエーテル(25ml)で希釈し、重炭酸ナトリウム(10ml)で冷却し、水(10ml)で洗浄し、濃縮し、そして硫酸マグネシウムで乾燥した。生成物は、フラッシュクロマトグラフィーまたは蒸留によって精製することができる。メタノール/水の3:1混合物(3モラー)中で、生成物を5当量の $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ にさらす。混合物を $25^{\circ}\text{C}$ で2時間攪拌し、エーテルで抽出し、1 mlの $\text{HCl}$ で酸性にする。沈殿物をガラスフィルター上に集め、フラッシュクロマトグラフィーまたは結晶化によってさらに精製することができる。

#### 化合物510の製造(化合物510の構造を図39に示す)

$\text{MeO}-\text{PEG}-\text{OH}$ (分子量500, シグマ社から市販)を17mMの塩化メチレン中に溶解して得られる溶液に、3.0当量の化合物509(図39)、3.0当量の1,3-ジクロロヘキシルカルボジイミド(DCC)、および0.75当量の4-DMAP(4-ジメチルアミノピリジン)を $25^{\circ}\text{C}$ にて加える。反応混合物を一晩攪拌する。次いで反応混合物を3.0当量のトリフルオロ酢酸(TFA)にさらし、 $25^{\circ}\text{C}$ でさらに1分攪拌する。反応混合物を氷冷エーテル(約17mM)中に注ぎ込んでPEGを沈殿さ

せ、次いで低温エーテルとエタノールで洗浄する。最終生成物は、高温エタノールからの結晶化によってさらに精製することができる。

#### 化合物511の製造(化合物511の構造を図39に示す)

##### 工程1: 活性化されたアザカルバメートの形成

化合物501(図36)、ビスペンタフルオロフェノールカーボネート(1.1当量)、および1.1当量のジメチルアミノピリジン(DMAP)を0.10モラーの塩化メチレン中に溶解して得られる溶液に、1.0当量のアルキル/アリアルヒドラジン(すなわち化合物502~507、図36, 37, および38)をシリンジポンプを介して $25^{\circ}\text{C}$ にて30~40分で滴下する。活性化されたアザカルバメートをフラッシュクロマトグラフィー、蒸留、または結晶化によってさらに精製する。

(51)

特表平10-506379

工程2： 活性化アザカルバメートのPEG支持体へのカップリング

1.0当量のPEG支持体（化合物510、図39）を17mMの塩化メチレン中に溶解して得られる溶液に、5.0当量の活性化アザカルバメート（上記の工程1において作製）と5.1当量の4-ジメチルアミノピリジン（4-DMA P）を25℃にて加える。反応混合物を24時間攪拌し、エーテル（17mMのジエチルエーテル）を加えて沈殿させる。エーテル（1X）および低温エタノール（1X）で洗浄することによって生成物をさらに精製する。

化合物512の製造（化合物512の構造を図40に示す）

化合物512は、下記の工程1～3の繰り返しサイクルにより形成される。

工程1： t-But 保護基の除去

1.0gの化合物511（図39）を10%のトリフルオロ酢酸／塩化メチレン溶液（10 mL, 1:1 TFA/塩化メチレン）にさらし、25℃で1時間攪拌する。エーテル（17mMのジエチルエーテル）を加えて反応混合物を沈殿させる。エーテル（1X）で洗浄することによって生成物をさらに精製し、エタノール（1X）から結晶化させることができる。

工程2： 活性化アザカルバメートの形成

化合物501（図36）、ビスペンタフルオロフェノールカーボネート（1.1当量）、および1.1当量のジメチルアミノピリジン（DMA P）を0.10モラーの塩化メチレン

ン中に溶解して得られる溶液に、1.0当量のアルキル／アリアルヒドラジン（すなわち化合物502～507、図36、37、および38）をシリンジポンプを介して30～40分で滴下する。次いでこの活性化アザカルバメートを、フラッシュクロマトグラフィー、蒸留、または再結晶によってさらに精製する。

工程3： 活性化アザカルバメートのPEG支持体へのカップリング

1.0当量のPEG支持体（化合物510、図39）を17mMの塩化メチレン中に溶解して得られる溶液に、5.0当量の活性化アザカルバメート（上記工程1にて作製）と5.1当量の4-ジメチルアミノピリジン（4-DMA P）を25℃にて加える。反応混合物を24時間攪拌し、エーテル（17mMのジエチルエーテル）を加えて沈殿さ

(52)

特表平10-506379

せる。エーテル (1X) で洗浄することによって生成物をさらに精製し、高温エタノールから再結晶することができる。

#### 化合物513の製造 (化合物513の構造を図40に示す)

この工程では、PEG支持体からアザーペプチドを取り外し、さらにベンジル保護基を取り除く。1.0gの化合物512 (図40) を10mLのメタノールに溶解して得られる溶液に、200mgの10% p d /Cを加える。反応混合物を水素バルーン (hydrogen balloon) でキャップし、一晩攪拌する。生成物をエーテルで洗浄し、濾過し、そして濃縮する。少量のペプチドに対して標準的なクロマトグラフィー法を適用することによって、さらなる精製を達成することができる。

#### 化合物514の製造 (化合物514の構造を図40に示す)

t-But保護基の除去。1.0gの化合物513 (図40) を10%のトリフルオロ酢酸/塩化メチレン溶液 (10mL, 1:1 TFA/塩化メチレン) にさらし、25℃で1時間攪拌する。生成物をエーテルで洗浄し、重炭酸ナトリウムで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして濃縮する。少量のペプチドに対して標準的なクロマトグラフィー法を適用することによって、さらなる精製を達成することができる。

### 実施例13

#### ピリジル主鎖組成物の可溶性組合せライブラリー

ピリジル主鎖組成物の可溶性組合せライブラリーは、広範囲の医学的、薬理的、および科学的用途に有用である。たとえば、ピリジル主鎖組成物の可溶性組

合せライブラリーは、天然ペプチドの活性と同等かあるいはより高い生物学的活性を示すペプチド類縁体を見いだすのに有用である。

### 実施例14

#### MeO-PEG-N<sub>[1]</sub>-N<sub>[2]</sub>-N<sub>[3]</sub>-N<sub>[4]</sub>-N<sub>[5]</sub>ペプチドライブラリーの合成

我々の帰納的デコンボリューション法を使用したペプチドライブラリーの合成により、LPCS法が実証された。前述したように、帰納的デコンボリューションの最も重要なポイントは、部分的に合成された組合せライブラリーのセットを造り上げ、これを保持することである。第1のLPCSライブラリーは4種の成分 (Tyr, Gly, Phe, およびLeu) と5つの部分サブライブラリーを



(53)

特表平10-506379

含み、トータルのライブラリーサイズは1024であった。4種の成分があったので、4つの合成チャンネルを使用した。このとき各チャンネルにおいては、いかなるときでも単一の成分を加えた。

プロセスを開始するにはMeO-PEGを4つの等しいプールに分割することが必要であり、このときTyr, Gly, Phe, およびLeuをホモポリマーにカップリングさせた。それぞれのカップリング反応が完了したら、ジエチルエーテルを加えることによってMeO-PEG-Naa (Naa=Tyr, Gly, Phe, Leu) の沈殿を起こさせた。MeO-PEG-Naaを濾過することによって、過剰なカップリング剤を除去することができた。MeO-PEGカップリング生成物を単純に再結晶することにより、より極性の高い汚染物を除去した。この工程の重要な点は、結晶化により混在物の取り込みが避けられるということである（混在物が取り込まれると、ゼリー状の沈殿物が生じることがある）。さらに、保護されたアミノ酸の過剰な分を定量的に除去することができる。これらの各サブライブラリーの一部を取り上げ、部分ライブラリーp(1)としてカタログ作成する。残りのMeO-PEG-Naaを合わせ、可溶化し、4つの部分に分離し、各チャンネルに装入し、Tyr, Gly, Phe, およびLeuを前記のように結びつけ、そしてポリマーサブライブラリーを沈殿させ、再結晶する。この場合も、このライブラリーのアリコート部分を部分ライブラリーp(2) (MeO-PEG-N<sub>11</sub>-Tyr, MeO-PEG-N<sub>11</sub>-Gly, MeO-PEG-N<sub>11</sub>-

Phe, およびMeO-PEG-N<sub>11</sub>-Leuで構成された4つのプールからなる)として取り上げる。残りをプールし、分割し、そしてサブライブラリーp(3)、p(4)、および最終ライブラリーのp(5)の集成体 (MeO-PEG-N<sub>11</sub>-N<sub>12</sub>-N<sub>13</sub>-N<sub>14</sub>-Tyr, MeO-PEG-N<sub>11</sub>-N<sub>12</sub>-N<sub>13</sub>-N<sub>14</sub>-Gly, MeO-PEG-N<sub>11</sub>-N<sub>12</sub>-N<sub>13</sub>-N<sub>14</sub>-Gly, MeO-PEG-N<sub>11</sub>-N<sub>12</sub>-N<sub>13</sub>-N<sub>14</sub>-Phe, MeO-PEG-N<sub>11</sub>-N<sub>12</sub>-N<sub>13</sub>-N<sub>14</sub>-Leu) に対して全体のプロセスを繰り返す。

#### 実施例15

MeO-PEG-N<sub>11</sub>-N<sub>12</sub>-N<sub>13</sub>-N<sub>14</sub>-N<sub>15</sub> ペプチドライブラリーの

(54)

特表平10-506379

帰納的デコンボリューション： アンチ- $\beta$ -エンドルフィンリガンドに  
対するスクリーニング

我々の帰納的デコンボリューション法に統合すると、ロイシンエンケファリン (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH) のアンチ- $\beta$ -エンドルフィン単クローン抗体 3E7 への結合を抑制する最適リガンドを明らかにできるような、拮抗 ELISA をベースとした方法が考案された (Meo, T., Gramsch, C., Inan, R., Hollt, V., Weber, E., Herz, A. & Reithmüller, G., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4084-4088, 1983)。この抗体は、高い親和性 ( $K_d = 7.1 \text{ nM}$ ) を有する天然エピトープに結合する。

ELISA を造り上げるためには、十分な疎水性をもつタンパク質への真正リガンド (true ligand) の結合を起こさせなければならなかった。C-末端ピリジニウムジスルフィド誘導体 1 (図 28) を化学的に合成するために、ある方策を施した。このタイプの合成法を使用することによって、活性化されたペプタイド 1 を、トラウト試薬 (Traut's reagent) で変性したウシ血清アルブミン (BSA) に速やかに且つクリーンに結合させた。このように、この BSA-1 コンjugate (BSA-1 conjugate) は、ペプタイドリガンドを ELISA プレート上に表示する方法を提供した。いくぶん明確ではないが重要なことは、チオピリジンが 343nm にて吸収されるので、本方策によりカップリングプロセスをモニターできるということである。ELISA プレートに固定されたこの BSA-Tyr-

Gly-Gly-Phe-Leu 単位により、アンチ- $\beta$ -エンドルフィンの固定化 Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu への結合に対する競合によって、溶液中での Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu またはその類縁体の定量化が可能となった。結合したアンチ- $\beta$ -エンドルフィンの量は、ELISA によって定量化することができる。

MeO-PEG の多様な可溶可能性により、 $\beta$ -エンドルフィン抗体への結合に対する均質競合 ELISA アッセイにて、保存・カタログ作成した (saved and catalogued) MeO-PEG サプライブラリーをスクリーニングする方法が得ら

(55)

特表平10-506379

れた(図31)。しかしながら、ライブラリーは“脱保護処理”できること、またリガンドのライブラリーのみが得られるようMeO-PEGを取り外すことができる、ということに留意しなければならない。これらのサブライブラリー混合物はさらに、見込みのある結合リガンドに対して類似の方法で研究することができ、また図31に示すように、検知された結合親和性は全く同等である。

デコンボリューション配列は、図31に示されている各p(n)サブライブラリーに関して決定される $IC_{50}$ 値を調べることによって求めることができる。したがって、ペントペプチドサブライブラリーp(5)の4つのプールで始めると(この場合は、N-末端アミノ酸だけが明らかにされる)、MeO-PEG-N<sub>(1)</sub>-N<sub>(2)</sub>-N<sub>(3)</sub>-N<sub>(4)</sub>-Tyr プールは検出可能な結合( $IC_{50}=51\mu M$ )のみを与える。帰納的方法に基づいて、Tyrを4つの保存・カタログ作成したp(4)サブライブラリーに結合させて、MeO-PEG-N<sub>(1)</sub>-N<sub>(2)</sub>-N<sub>(3)</sub>-Gly-Tyr、MeO-PEG-N<sub>(1)</sub>-N<sub>(2)</sub>-N<sub>(3)</sub>-Phe-Tyr、MeO-PEG-N<sub>(1)</sub>-N<sub>(2)</sub>-N<sub>(3)</sub>-Leu-Tyr、およびMeO-PEG-N<sub>(1)</sub>-N<sub>(2)</sub>-N<sub>(3)</sub>-Tyr-Tyrを得る。これらの4つの新たなプールのアッセイにより富化工程(enrichment step)が得られる、さらに重要なことには、このアッセイは次の残部であるグリシンをデコンボリュートする(MeO-PEG-N<sub>(1)</sub>-N<sub>(2)</sub>-N<sub>(3)</sub>-Gly-Tyr,  $IC_{50}=7.7\mu M$ )。これらの結果により、次の保存サブライブラリーp(3)に対する論理的処理(logical procession)が可能となり、このときチロシンとグリシンの両方を、プールされた4つのp(3)配列体に結合させる。第3のアミノ酸

に対する解明作業ではユニークな結果が得られなかったが、MeO-PEG-N<sub>(1)</sub>-N<sub>(2)</sub>-Gly-Gly-Tyr(活性エピトープの配列に対応した配列)は最も強力なバインダーであった( $IC_{50}=1.1\mu M$ )。p(2)サブライブラリーは類似の方法にて解明されたが(下記を参照)、2つのプール[(MeO-PEG-N<sub>(1)</sub>-Phe-Gly-Gly-Tyr,  $IC_{50}=0.18\mu M$ )という予測配列を有するプール、および(MeO-PEG-N<sub>(1)</sub>-Leu-Gly-Gly-Tyr,  $IC_{50}=4.0\mu M$ )という配列を有するプール]が見いだされた。この点において、Tyr-

(56)

特表平10-506379

Gly-Gly-PheとTyr-Gly-Gly-Leuの両方の配列体を続けてトレースすることによって、これに代わる活性メンバーの演繹を行うことができた。しかしながら、我々は、“固相”帰納的アコンボリューション法にしたがって同じペプタペプチドライブラリーを既に調べてあるので、繰り返しプロセスによって最も活性な成分(Tyr-Gly-Gly-Phe)を求めるだけに決定した。図30において、最終的なp(1)サブライブラリーにより、我々は活性エピトープと他の幾つかの強力なバインダーを得た。

実施例16：非ペプチド、非オリゴマー分子：スルホンアミドの液相合成および特性

前記のLPCS法は、使用する化学反応がポリマーの性質と相互作用せず、すなわち、ポリマーの性質に悪影響を与えない限り、いかなる種類の分子体の合成をも考慮に入れることが望ましい。ペプチド結合および脱保護反応以外の条件下で、MeO-PEG担体を調べる出発点として、スルホンアミドと呼ぶ1種の化合物の合成に関連してポリマーの利用可能性を検討した。スルホンアミドは、低コストと感染しやすい伝染病に対するすばらしい効果のために、多年にわたり数多くの類似体の調製を促してきた。しかし、細菌の抵抗性、比較的狭い細菌生長抑制範囲および患者によっては好ましくない副作用のために、抗菌性スルホンアミドはもはや曾てのように臨床的に用いられなくなっている。面白いことには、これら広範囲の臨床的研究のために、いくつかの好ましい驚くべきことがこの研究から生まれた。すなわち、抗菌性効果の乏しかった多くのアリアルスルホン酸アミドが今や新種薬剤の手掛りを与えるに至った。該薬剤の中には新種のエンドテリンアンタゴニスト、抗腫瘍剤があり、さらに／または抗不整脈作用を有するものもある(31)。アリアルスルホンアミド核はこのように組合せライブラリーを作る上の重要な薬剤搬送体(pharmacophore)と思われる。

いかなる大きさのライブラリーも入手可能となる前には、多くの化学反応に対して信頼しうる実験計画とともに一般的合成機構を検討しなければならない。薬剤をもたらしたアリアルスルホンアミドの過去の合成は2つのかなり簡単な経路の1つ(図29)によって達成された(Ellingboe, J. W., Spinelli, W., Win-

(57)

特表平10-506379

Idley, M.W., Nguyen, T. T., Parsons, R. W., Moubarak, I. F., Kitzen, J.M., Vonengen, D. および Bagli, J. F., J. Med. Chem. 35:707-716, 1992)。第1の方法では、アセトアニリドのクロロスルホン化が対応するスルホニルクロリド2をもたらし、また適切なアミンとの反応によって中間体3が得られる。酸または塩基性加水分解の結果はスルファニルアミド4を生成する。別の方法では、アミド生成が、パラニトロベンゼンスルホニルクロリド5について行われる。化学的または接触的方法による還元は、直接所望の生成物をもたす。我々は、2のようなアリールスルホニルクロリド(図29)が我々のMeO

-PEG合成における重要な中間体であり、いずれの径路もこのような中間体をもたすけれども、いずれも該アリールスルホニルクロリド付加物を結合させる都合のよい手掛りを与えないと考えた。

付加多様性に適応性を与え、所望のアリールスルホニルクロリドを簡単に包含する新径路(図30)が考案された。4-(クロロスルホニル)フェニルイソシアネートから出発することにより、MeO-PEG担体は機能的であることができ、所望のスルホニルクロリド中間体6が一工程で得られる。もっとも印象的であるのは、このカップリング反応中、クロロスルホン酸部分において求核プロセスに拮抗するものがないことである。同様に重要であるのは、この結合が、この反応後にプロトンNMR分析を可能にし(図32)、種々のスルホニル求核付加反応と適合性があり、さらに合成の最後に、アリールスルホンアミドをMeO-PEGに結合させているカルバメートを容易に分解させて(NaOH)、その生成物を均質担体から単離させることである。図30に示す反応機構を用いて、我々は数ミリグラム量の構造的に異なるアリールスルホンアミド8を合成した。その重要な中間体はスルホニルクロリド6であるけれども、図32に示すように合成されたアリールスルホンアミドの全般的な成功は、求核試薬のpKaによることが大きいことに注目すべきである。したがって、7eおよび7fのような極めて質の劣る求核試薬にはより長い反応時間およびさらに厳しい温度が必要である(図32)。

最初に化学的に合成された組合せライブラリーは、固体担体上に得られたペブ

(58)

特表平10-506379

チドライブラリーであった (Geysen, H. M., Rodda, S. J. および Mason, T. J. , Mol. Immunol. 23 : 709-715, 1986 ; Lam, K. S., Salmon, S. E., Hersch, E. M., Hruby, V. J., Kazmierski, W. M. および Knapp, R. J., Nature(London) 354 : 82-84, 1991 ; Houghton, R. A., Pinilla, C., Blondeille, S. E., Appel, J. R., Dooley, C. T. および Curevo, J. H., Nature(London) 354 : 84-86, 1991 ; Fodor, S. P. A., Read, J. L., Pirrung, M. C., Styer, L., Lu, A. T. および Solas, D., Science 251 : 767-773, 1991)。この研究と同様に重要なことは、より大きな化学的多様性に対する要望が急速に認められ、非オリゴマー複素環式化合物ライブラリ

ーの急増が組合せ分野を支配し始めたことであった (Bunnin, B. A., Plunkett, M. J. および Ellman, J. A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 : 4708-4712, 1994 ; Gordon, D. W. および Steele, J., Bioorg. Med. Chem. Lett. 5 : 47-50, 1995 ; Pirrung, M. C. および Chen, J., J. Am. Chem. Soc. 117 : 1240-1245, 1995 ; Willard, R., Jammalana-daka, V., Zava, D., Hunt, C. A., Benz, C. C., Kushner, P. J. および Sc-anlan, T. S., Chem. Biol. 2 : 45-51, 1995)。この種のライブラリーは、結果的に固相合成を多段有機反応シーケンスに適合させようとする精力的な努力をもたらした。我々は、この方法をさらに発展させ、単純な液相組合せ合成と呼ぶ技術を提案し、実行している。この方法において、我々は古典的有機合成が溶液状態で与える利点を、固相合成がもたらすことができる利点とともに利用する。この論文で報告する結果は、LPCSの反応の及ぶ範囲が多方面にわたるべきであることを示している。多重高収量スクリーニングテスト (multi-high-through-put screening assay) に対する価値は、数ミリグラム量の各ライブラリー成員を得ることができるので、際立ったメリットを有することができた。概説した原理および方法を用いるLPCSは複雑な化学構造物合成のライブラリーのみならず化学的多様性の項目に入る他のプロセスにも適用しうることが望ましい。

#### 材料および方法

概説。

(59)

特表平10-506379

BOCで保護したアミノ酸は Bachem Cariforniaから購入した。N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート (SPDP) は Prochemから購入した。ポリ(エチレングリコール)メチルエーテル (M. W. 5000) を含む他の試薬はすべて Aldrichから購入した。塩化メチレンおよびクロロホルムは  $\text{CaH}_2$  を用いる蒸留で精製し、メチルアルコールはマグネシウムの削り屑を用いて蒸留した。N,N-ジメチルホルムアミドはオープンで乾燥したモレキュラーシーブ (4A) を用いて連続的に脱水した。他の溶剤は、特記しなければ購入したまま使用した。TLC溶離液は  $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{AcOH} : \text{H}_2\text{O} = 83 : 15 : 1 : 1$  であった。UVスペクトルは室温において Hewlett-

Packard 8452A ダイオードアレイ分光光度計で測定した。

ペントペプチドライブラリーの構成。

分割合成 (13) および Bayer の手法 (7) に下記の修正を施して、モノメトキシポリエチレングリコール (MeO-PEG) ポリマー担体上に手動でペントペプチドライブラリーをつくった。N-BOC-L-Leu、N-BOC-Gly、N-BOC-L-Phe および N-BOC-O-(2-Br-Cbz)-Tyr がライブラリーを構成するアミノ酸成分であった。第1のアミノ酸残基は DCC/DMAP カップリング法 (Zalipsky, S., Gilon, C. および Zilka, A., *J. Macromol. Sci. Chem.* A21:839-834, 1984) によって MeO-PEG に固着させた。このカップリング効率は、触媒量のジブチルスズラウレートの存在下で、MeO-PEG の未反応ヒドロキシル基とフェニルイソシアネートとの反応によって定量的に生成させたフェニルカルバメート誘導体の吸光度 ( $\epsilon_{236\text{nm}} = 17,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) を基準として99%を上回ることが確かめられた。次のアミノ酸は、O-ベンゾトリアゾール-1-Y-L-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (HBTU) およびジイソプロピルエチルアミン (DIPEA) を用いて逐次付加させた (Dourtoglou, V., Gross, B., Lambropoulou, V., および Zioudrou, C., *Synthesis* A:572-574, 1984)。各カップリング反応は、Kaiser のニンヒドリン試験 (Kaiser, E., Collescott, R. L., Bossinger, C. D. および Cook, P. J.

(60)

特表平10-506379

, Anal. Biochem. 34:595-598, 1979) が負になるまで、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  と DMF との混合溶剤中で行い、未カップルアミノ基を閉塞させるのに無水酢酸を使用した。各カップリング工程後、組合せ化学ライブラリーの帰納的デコンボリューション法 (recursive deconvolution method) (12) により他日使用するためにポリマーの一部を残しておいて標識した。ヨードトリメチルシランによる  $\text{N-BOC}$ -および  $\text{O-(2-Br-Cbz)}$ -基の最終脱保護 (Lott, R. S., Chauhan, V. および Stammer, C. H., J. Chem. Soc. Chem. Commun. 495-496, 1979) によってペントペプチドライブラリーの構成が完了した。

[Leu<sup>5</sup>] -エンケファリン-ウシの血清アルブミン結合体 (BSA-1) の

調製。

[Leu<sup>5</sup>] -エンケファリンをウシの血清アルブミンとカップルさせて BSA-1 をつくった。BSA-1 を調製するのに用いた機構を図 28 に示す。1 と BSA とのカップリングには Traut's 試薬によって BSA をスルフヒドリル化タンパク質への再形成させることが必要なことに留意すべきである。

$\text{N-Boc-O-t-ブチル-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-CO}_2\text{-PEG-OMe}$ 。

$\text{MeO-PEG}$  (5 g, 1 ミリモル)、 $\text{N-Boc-Leu-H}_2\text{O}$  (0.748 g, 3 ミリモル)、および DMAP (0.0306 g, 0.25 ミリモル) を塩化メチレン (25 mL) に溶解し、DCC (1.24 g, 6 ミリモル) を加えた。室温下で 2 時間攪拌後、無水酢酸 (1 mL) を加えて、さらに 30 分間攪拌を続けた。尿素を濾別し、濾液に激しく攪拌しながら徐々にエチルエーテルを加えた。沈澱をガラスフィルター上に集めた後、DMF に再溶解させた。エチルエーテルを加えて化合物を再沈澱させ、沈澱をエタノールで洗って純  $\text{N-BOC-Leu-CO}_2\text{-PEG-OMe}$  (I) (5.15 g, 99%) を得た。I (5.15 g) を塩化メチレン：トリフルオロ酢酸混合物 (1:1, 40 mL) に溶解し、室温下で 30 分攪拌した。溶剤の容量を 1/2 に減らし、エチルエーテルを徐々に加えてトリフルオロ酢酸アンモニウム塩 (II) を白色沈澱 (4.98 g



(61)

特表平10-506379

、96%)として得た。II (4 g、0.765ミリモル)、N-BOC-Phe (0.609 g、2.30ミリモル)、およびDIPEA (1.3 g、7.65ミリモル)を塩化メチレンとDMFとの混合物(25 mL)に溶解した後、HB TU (0.871 g、2.30ミリモル)を加えた。Kaiserのニンヒドリン試験により負の読みが得られるまで、この反応をモニターした。次に無水酢酸(1 mL)を加えて、さらに30分攪拌を続けた。この反応混合物を1/2の容量まで濃縮した。エチルエーテルによる沈澱、DMF中への再溶解、エーテルによる再沈澱および沈澱のエタノールによる最終洗浄の逐次操作によってN-BOC-Phe-Leu-CO<sub>2</sub>-PEG-OMe (III) (3.91 g、95%)を得た。TFA:塩化メチレン混合物によるN-BOC基の脱保護によってトリフルオロ

酢酸アンモニウム塩 (IV) を白色沈澱として得た (3.75 g、96%)。N-BOC-Gly、N-BOC-Phe、およびN-BOC-O-t-ブチル-Tyrによるカップリングおよび脱保護の1サイクルの繰返しによってN-Boc-O-t-ブチル-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-CO<sub>2</sub>-PEG-OMe (2.51 g、96%)を得た。

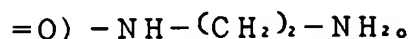
N-Boc-O-t-ブチル-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-CO<sub>2</sub>Me。

N-Boc-O-t-ブチル-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-CO<sub>2</sub>-PEG-OMe (2 g、0.35ミリモル) およびKCN (200 mg、3.08ミリモル)をMeOH (10 mL)に溶解して、TLCによるモニターを行いつつN-Boc-O-t-ブチル-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-CO<sub>2</sub>-PEG-OMeを消失するまで室温下で攪拌した(24時間)。この反応混合物を3 mLに濃縮し、1N HClで酸性にし、さらにEtOAcで2回抽出した。酢酸エチル層を合わせて食塩水で洗って、MgSO<sub>4</sub>で乾燥した。溶剤を減圧で除去して、所望の生成物を得た(0.273 g、93%)。TLC R<sub>f</sub> 0.61; エレクトロスプレーMS m/z 726 (M+H<sup>+</sup>)、748 (M+Na<sup>+</sup>)。

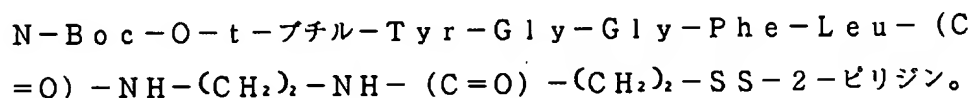
N-Boc-O-t-ブチル-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-(C

(62)

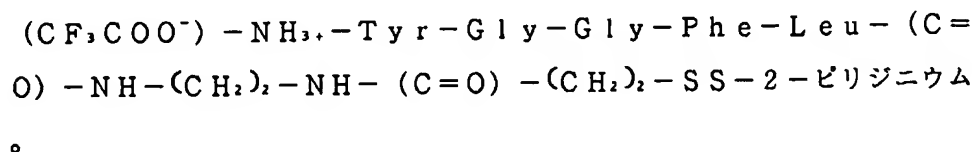
特表平10-506379



該ペプチドメチルエステル (80 mg、0.11ミリモル)、NaCN (20 mg、0.41ミリモル)、およびエチレンジアミン (400  $\mu$ L、5.99ミリモル) を MeOH に溶解した。得られた混合物を 45  $^{\circ}$ C で 8 時間加熱した。この反応混合物を冷却し、濃縮して 1 N HCl で酸性にした。このものを EtOAc と CuSO<sub>4</sub> 水溶液との間に分配させ、有機層を酢酸エチル溶液中にエチレンジアミンが認められなくなるまで CuSO<sub>4</sub> 水溶液で連続的に洗った。この酢酸エチル溶液を MgSO<sub>4</sub> で乾燥し、溶剤を除去して所望の生成物 (62 mg、75%) を得た。TLC R<sub>f</sub> 0.15; エレクトロスプレー-MS m/z 754



該ペプチドアミド (9.2 mg、12 マイクロモル) および N-スクシンイミジル-3-(2-ビリジルジチオ) プロピオネート (3.8 mg、12 マイクロモル) (SPDP) を MeOH (5 mL) に溶解した。2 滴のトリエチルアミンを加え、反応混合物を室温下で 1 時間攪拌した。この反応物を蒸発乾固し、予備 TLC により精製した (10.7 mg、92%)。TLC R<sub>f</sub> 0.55; FAB-MS m/z 951 (M+H<sup>+</sup>)、973 (M+Na<sup>+</sup>)。



トリフルオロ酢酸 (2 mL) 中で前記 N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (10.7 mg、11.3 マイクロモル) を 17 時間攪拌することによって N-BOC 基および O-t-ブチル基を脱保護させた。揮発分をすべて除去し、エチルエーテルを加えて所望の生成物を黄褐色固体として得た (11 mg、95%)。FAB-MS m/z 795 (M+H<sup>+</sup>)、817 (M+Na<sup>+</sup>)。

[Leu<sup>3</sup>] - エンケファリン-ウシの血清アルブミン結合体。

(63)

特表平10-506379

前記の塩 (2 mg、1.96 マイクロモル) を DMF (50  $\mu$  L) に溶解し、その溶液を PBS (1 mL) 中のウシの血清アルブミン (Traut 試薬によりスルフィドリル化したもの) に徐々に加えた。10 分後、その一部の 50  $\mu$  L を移して希釈し 1 mL とした。[Leu<sup>5</sup>] - エンケファリン - ウシ血清アルブミン結合体の濃度は、2-チオピリジンの生成 ( $A_{344} = 0.2529$ ) を基準にして 0.8 mM と求められた。ピリジン - 2-チオンは 343 nm において 8080 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> のモル吸光係数を示す。

抗  $\beta$ -エンドルフィン単クローン抗体のための部分ライブラリー競合 ELISA

Costar のくぼみが 96 個のマイクロタイタープレートの各くぼみを、一夜間、当初 60 mM 重炭酸ナトリウム / 30 mM 炭酸ナトリウム中 BSA-1 (5-20 mg/mL) の溶液 (pH 9.3) 25  $\mu$  L で被覆した。そのくぼみを脱イオン水で洗い非特異吸着を防ぐために 100  $\mu$  L の BLOTTO でブロックした。加湿チャンバー内で、37  $^{\circ}$ C<sup>1</sup>/<sub>2</sub> 時間温置した後、BLOTTO を振り落とし、25  $\mu$  L の部分ライブラリープール (競合抗原) を第 1 のくぼみに加え、プレート全体を逐次希釈して、さらに第 2 列の第 1 のくぼみに同じプロセスを続けた。レーン 12 は陽性のコントロールとして用いた (この一連の希釈工程を、すべての競合部分ライブラリープールに用いたことに注目すべきである)。各くぼみにその抗  $\beta$ -エンドルフィン抗体を加え (25  $\mu$  L)、さらにプレートを 37  $^{\circ}$ C で 2 時間温置した。そのプレートは脱イオン水で 20 回洗い、各くぼみにヤギで作製した抗マウス IgG-グルコースオキシダーゼ結合体 (Cappel) の 1:1000 希釈液 25  $\mu$  L を加えて、そのプレートを 37  $^{\circ}$ C で 1 時間温置した。そのプレートは脱イオン水で 20 回洗い、各くぼみに 50  $\mu$  L の顕色剤 (developing agent) (5 mL のリン酸塩緩衝液、pH 6.0 中 0.6  $\mu$  L の 20% グルコース、40  $\mu$  L の ABTS、40  $\mu$  L の HRP O) を加えて結合抗体を検知した。30 分後に 405 nm においてプレートの読みを取った。

スルホンアミドライブラリーの構成。

並行合成によって、MeO-PEG 担体上にアリアルスルホンアミドライブラ

(64)

特表平10-506379

リーをつくった。触媒量のジブチルスズラウレートの存在下で、MeO-PEGを4-(クロロスルホニル)フェニルイソシアネートと反応させて、MeO-PEGの4-(クロロスルホニル)フェニルカルバメート(6)を得た。化合物6を6つの部分に分け、ピリジンの存在下で各部分を6種類のアミンと反応させてスルホンアミド類7を得た。これらMeO-PEGスルホンアミドの塩基性加水分解によって、6成員より成るアリアルスルホンアミドライブラリーの構成が完了した(図30)。

O-(MeO-PEG)-N-[(4-クロロスルホニル)フェニル]カルバメート。

4-(クロロスルホニル)フェニルイソシアネート(0.653g、3ミリモル)を塩化メチレン(50mL)中のMeO-PEG(5g、1ミリモル)溶液に加えて2滴のジブチルスズラウレートを添加した(Bayer, E., Gatfield, I., Mutter, H. および Mutter, M., Tetrahedron 34:1829-1831、1978)。室温下で5時間攪拌後、激しく攪拌しつつある反応混合物にエチルエーテルを徐々に加えた。沈澱をガラスフィルター上に集めてエチルエーテルでよく洗った。沈澱を真空下で乾燥して、所望の生成物を定量的に得た。

N-(4-アルキルアミノスルホニル)フェニル-O-(MeO-PEG)カルバメート。

i) ピリジン(20当量)含有塩化メチレン(5mL)中O-(MeO-PEG)-N-[(4-クロロスルホニル)フェニル]カルバメート(0.5g、95.8マイクロモル)の溶液に室温下でアンモニアガスを24時間連続的に吹き込むか(A方法)、ii) ピリジン(20当量)含有塩化メチレン(5mL)中で過剰のアミン(15当量)とともに、O-(MeO-PEG)-N-[(4-クロロスルホニル)フェニル]カルバメート(0.5g、95.0マイクロモル)を室温下で24時間攪拌するか(B方法)(Winterbottom, R., J. Am. Chem. Soc. 62:160-161、1940)、または iii) 反応混合物をピリジン溶剤中で65℃で1時間加熱することによって(Caldwell, W. T., Kornfeld, E. C., および Donnell, C. K., J. Am. Chem. Soc. 63:2188-2190、

(65)

特表平10-506379

1941)、N-(4-アルキルアミノスルホニル)フェニル-O-MeO-PEGカルバメートを調製した。このMeO-PEGポリマーをエチルエーテルを加えて均質溶液から沈澱させ、エタノールで洗い、真空乾燥して所望の生成物を定量的に得た。

スルホンアミド。

N-(4-アルキルアミノスルホニル)フェニル-O-(MeO-PEG)カルバメート(0.45g)を0.5N NaOH(10mL)に溶解し、90℃で30分加熱した(Winterbottom, R., J. Am. Chem. Soc. 62:160-161, 1940; Caldwell, W. T., Kornfeld, E. C., および Donnell, C. K., J. Am. Chem. Soc. 63:2188-2190, 1941)。その反応混合物を4℃に冷却し、濃HClでpH6-8に中和した。その反応混合物を酢酸エチルで3回抽出し、酢酸エチル層を合わせて、食塩水で洗い、MgSO<sub>4</sub>で乾燥した。溶剤を除去して、分析的に純粋な生成物(NMRスペクトルを基準にして)を得た。反応物の収率は概して95-97%であった。

液相組合せ合成(LPCS)と呼ぶ新規概念について述べる。この方法の中心的な特徴は、この方法が、線状均質ポリマーの適用によって、溶液状態における古典的有機合成が与える利点と固相合成がもたらすことができる利点とを利用するということである。この考えが正しいことを証明するために、1つはペプチド系、他は非ペプチド系の2つのライブラリーを調製した。このペプチド系ライブラリーは帰納的逆重畳積分法を用いて合成し(Erb, E., Janda, K. D., Brenner, S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11422-11426, 1994)、このライブラリー中に、 $\beta$ -エンドルフィンに対して作成された単クローン抗体と結合するいくつかのリガンドを見出した。合成された非ペプチド分子はアリールスルホンアミドであって、この種の化合物はその公知の臨床的殺菌効果に基づいて選抜された(Maren, T. H., Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 16:309-327, 1976)。この論文で報告する結果は、数ミリグラム量の各ライブラリー成員を容易に得ることができるので、多重高処理(multiple high-throughput)スクリーニングテストに対する価値は際立ったメリットを有するこ

(66)

特表平10-506379

とができたと同時に、LPCSの反応の及ぶ範囲が多方面にわたるべきであることを示している。

#### 合成方法

化合物3または4の調製（化合物3および4の構造は図33に示す）。

Whistler, R.が *Methods in Carbohydrate Chemistry*, II, 1963, p 32

7に述べた方法。メタノール200ミリリットル (mL) 中 Aldrich chemical company から入手した無水のD-グルコサミン塩酸塩またはD-ガラクトサミン塩酸塩80グラム (g) の溶液および Dowex 50 (H<sup>+</sup>) 酸性樹脂20gの混合物を丸底フラスコ中で沸点において攪拌する。24時間の反応時間後、濾過して該樹脂を除去し、20mLのメタノールで3回洗う。濾液と洗浄液とを合わせて rotovap により約125mLに濃縮する。この濃縮液を室温に冷却し、結晶化またはフラッシュカラムクロマトグラフィーで精製して3または4を得、さらに次のように続行する。

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.4モル) 中粗製物 (1.0当量) の溶液を0℃に冷却する。その溶液を次に4-DMAP (0.2当量)、トリエチルアミン (8.0当量) と処理し、無水酢酸 (365mL、3.84ml、7.0当量) を1滴ずつ加える。この反応物を0℃で1時間攪拌した後、0℃で5% HCl を1滴ずつ加えて反応を制止させるかまたはpHが中性になるまで攪拌する。次に反応物をエーテルで希釈した後NaHCO<sub>3</sub>飽和水溶液 (2×)、水 (1×) および食塩水 (1×) で洗う。この水層をエーテル (1×) で逆抽出してから当初の有機相と再び一緒にして、乾燥 (MgSO<sub>4</sub>) 後蒸発させる。

メタノール (0.5モル) 中粗製物 (1.0当量) の溶液をNaOMe (0.1当量) と処理し、25℃で24時間攪拌する。次に反応混合物を濃縮してフラッシュカラムクロマトグラフィーで精製するかまたは結晶化させて化合物3または4を得る。

化合物5または6の調製（化合物5および6の構造は図23に示す）。

塩化メチレン中3または4の溶液 (0.5モル) に、Aldrich company から購入したベンズアルデヒドジメチルアセタール (1.2当量)、ZnCl<sub>2</sub> (0.

(67)

特表平10-506379

1当量)を加え反応混合物を25℃で一時間攪拌する。次に生成物5または6を結晶化させるかもしくはフラッシュカラムクロマトグラフィーで精製して、次の工程を続ける。

化合物7または8の調製 (化合物7および8の構造は図33に示す)。

DMF (0.5モル) 中アルコール5または6 (1.0当量) の溶液に数回に分けてKH (1.1当量、鉱油中35%分散液) を加える。この反応混合物を室温に温め、1時間攪拌する。次に、この反応物を0℃に冷却して臭化ベンジル (1.1当量) と処理して、1.5時間攪拌する。塩化アンモニウム飽和溶液を1滴ずつ加えて0℃の反応混合物の反応を制止させ、混合物を酢酸エチル (2L) で希釈し、水 (2×100mL)、食塩水 (1×100mL) で洗い、MgSO<sub>4</sub> で乾燥して蒸発させる。結晶化またはフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して7または8を得る。

化合物9または10の調製 (化合物9および10の構造は図34に示す)。

Johansson, R., Samuelsson, B. が J. Chem. Soc., Chem. Commun., 201, 1984 に記述したような条件。粉末状3Åモレキュラーシーブを含有するジメチルホルムアミド (DMF) (0.1モル) 中7または8 (1.0当量) および水素化シアノホウ素ナトリウム (5.0当量) の溶液に0℃で、DMF (1.0モル) に溶解したトリフルオロ酢酸 (10当量) を添加する。TLCが反応の完了を示すときに、フラッシュカラムクロマトグラフィーまたは結晶化により生成物を精製して、所望の9または10を得る。

化合物11または12の調製 (化合物11および12の構造は図34に示す)。

塩化メチレン (0.10モル) 中中間体9または10 (1.0当量) の溶液に0℃で2,6-ルチジン (1.3当量) を溶解する。トリイソプロピルまたはトリエチルシリルトリフルオロメタンスルホネート (1.3当量) を次に加えた後、2時間攪拌してから、ジエチルエーテルで反応物を希釈し、塩化アンモニウム (2×)、食塩水 (1×) で洗った後結晶化により精製する。化合物は次のように手順を進める。

この中間体は次に酢酸 (0.5モル) 中無水酢酸 (1.1当量) の混合液に曝

(68)

特表平10-506379

露し、0℃ないし60℃で1時間攪拌する。反応完了後、混合物を塩化メチレンで希釈し、 $\text{NaHCO}_3$ で中和した後水(1×)および食塩水で洗う。次に化合物をエーテルで沈澱させ、エタノールから再結晶させて、次のように手順を進める。

この中間体を塩化メチレン(0.1モル)中 Aldrich Companyから得たテトラブチルアンモニウムフルオリド(1.5当量)の混合物に曝露して、0℃で1時間攪拌する。次にこの化合物を塩化メチレンで希釈し、 $\text{NaHCO}_3$ で中和してから水(1×)および食塩水で洗う。この化合物はさらにエーテルで沈澱させ、エタノールから再結晶させて化合物11または12を得る。

化合物15または16の調製(化合物15および16の構造は図34に示す)。

Whistler, R.が Methods in Carbohydrate Chemistry, II, 1963, p 327に記述したような方法。200 mLメタノール中 Aldrich chemical companyから得た無水のD-グルコースまたはD-ガラクトース80 gの溶液およびDowex × 50 ( $\text{H}^+$ ) 酸性樹脂20 gの混合物を丸底フラスコ中で沸点で攪拌する。24時間の反応時間後、濾過して樹脂を除去し、20 mLのメタノールで3回洗う。濾液と洗液とを一緒にして rotovapにより約125 mlに濃縮する。この濃縮液を室温に冷却して一週間生成物を結晶化させる。

化合物17または18の調製(化合物17および18の構造は図34に示す)。

テトロール15または16(1.0当量)をベンゼン(2×100 mL)と共沸させた後真空下で $\text{P}_2\text{O}_5$ を用い一週間乾燥する。トリオール、ジブチルスズオキシド(1.2当量)および乾燥メタノール(0.25モル)の混合物を、溶液が透明かつ均質になるまで4時間還流加熱する(自動攪拌装置が必要かもしれない)。次に溶剤を真空除去して、泡の多い白色のスズ錯体を得、これをさらにベンゼン(2×100 mL)と共沸させ、 $\text{P}_2\text{O}_5$ を用い真空下で乾燥する(2時間ないし一週間)。次に無水DMF(2.18 L、0.2モル)を加えてスズ錯体を再溶解させた後、 $\text{CsF}$ (1.2当量)および最後に臭化ベンジル(0.5当量)を加えてから一週間加熱する(40℃)。この透明な溶液を真空下で部分蒸留(3.3 mmHg、75-100℃)して、当初の1/5の容積の溶剤とする。次



(69)

特表平10-506379

に反応混合物を酢酸エチル (2 L) で希釈し、少量の水 (2 × 100 mL) で洗いセシウム塩を除く。酢酸エチル (3 × 500 mL) で水層を逆抽出してから

有機層と再び一緒にしてMgSO<sub>4</sub>で乾燥後蒸発させる。フラッシュカラムクロマトグラフィーまたは結晶化による精製を行って所望のトリオール17または18を得る。

化合物19または20の調製 (化合物19および20の構造は図35に示す)。

DMF (0.25モル) 中トリオール17または18 (1.0当量) の溶液に、0℃で数回に分けてKH (3.3当量、鉱油中35%分散液) を加える。反応混合物を室温に温めて1時間攪拌する。次に、この反応物を0℃に冷却し、臭化ベンジル (3.3当量) と処理して1.5時間攪拌する。塩化アンモニウム飽和溶液を一滴ずつ加えて反応混合物の反応を制止させ、混合物を酢酸エチル (2 L) で希釈し、水 (2 × 100 mL)、食塩水 (1 × 100 mL) で洗い、MgSO<sub>4</sub>で乾燥して蒸発させる。結晶化またはフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して19または20を得る。

化合物21または22の調製 (化合物21および22の構造は図35に示す)。

ベンゾエート19または20 (1.0当量) の溶液にTHF (0.464モル) を加えて、溶液を0℃に冷却する。この反応混合物をDIBAL (1.1当量) の1.0モル溶液に曝露して2.5時間攪拌する。次にこの溶液をエーテル (5 mL) で希釈してから2 mLのロッシェル塩 (酒石酸ナトリウムカリウム飽和溶液) を加え、混合物をさらに1時間25℃で攪拌する。この反応物を次に水 (2 × 10 mL)、食塩水 (1 × 5 mL) で洗ってからMgSO<sub>4</sub>で乾燥する。化合物はフラッシュカラムクロマトグラフィーまたは結晶化で精製する。

化合物23または24の調製 (化合物23および24の構造は図35に示す)。

塩化メチレン (0.10モル) 中、中間体21または22 (1.0当量) の溶液に0℃で2,6-ルチジン (1.3当量) を溶解させる。トリイソプロピルまたはトリエチルシリルトリフルオロメタンスルホネート (1.3当量) を次に加えた後、2時間攪拌してから反応物をジエチルエーテルで希釈し、塩化アンモニウム (2 ×)、食塩水 (1 ×) で洗った結晶化により精製する。化合物は次のよ

(70)

特表平10-506379

うに手順を進める。

中間体は、次に酢酸（0.5モル）中無水酢酸（1.1当量）の混合物に曝露して、0℃で1時間攪拌する。反応完了後、混合物を塩化メチレンで希釈し、 $\text{NaHCO}_3$ で中和してから水（1×）および食塩水で洗う。この化合物をエーテルで沈澱させ、エタノールから再結晶させ、次のように手順を進める。

この中間体を塩化メチレン（0.1モル）Aldrich companyから得たテトラブチルアンモニウムフルオリド（1.5当量）の混合物に曝露して、0℃で1時間攪拌する。この化合物は、次に塩化メチレンで希釈し、 $\text{NaHCO}_3$ で中和してから水（1×）および食塩水で洗う。この化合物はさらにエーテルで沈澱させ、エタノールから再結晶させて化合物23または24を得る。

化合物27または28の調製（化合物27および28の構造は図35に示す；図19をも参照のこと）。

エーテルおよびアミド結合のような他の官能性も、PEG可溶性担体とヌクレオチドコア分子とのリンカーとして適しているけれども、このC-4で分化させた炭水化物23または24は、エステル/スクシニル結合を介して（スクシニルクロリド1.5当量、DMA P-ジメチルアミノピリジン1.1当量、ピリジン0.5モル）PEG（好ましくはそのモノメチルエーテル、分子量5,000、Aldrich, Fluka または Sigma chemical company 製）にカップルさせる。化合物25または26とのPEGスクシネートのカップリングは、Keckらが開発したDCC/DMA P条件（J. Org. Chem. 50:2394, 1985）を用いる標準活性化エステル法によって行われる。PEGをBoc-Gly-OH残基に結合させる標準の実験計画については、Bayery らの The Peptides、2:309, Academic Press, 1979 参照のこと。次に所望の化合物27または28はエーテルおよびエタノールからの沈澱および再結晶によって精製される。

一般的な手順は次の通りである。保護された糖23または24、無水コハク酸（5当量）およびDMA P（1当量）を室温下で乾燥ピリジン（0.20モル）中で攪拌する。反応完了後、蒸発によりピリジンを除き、残留物を酢酸エチル中でフラッシュクロマトグラフィーにかける。次にPEGのモノメチルエーテル

(71)

特表平10-506379

(0.8当量)を3-0-ヘミスクシネート25または26と混合し、乾燥剤五酸化リン $P_2O_5$ を用いて一週間高真空で乾燥する。次にこの混合物を、無水塩化メチレン(0.5モル)および触媒量のジメチルアミノピリジン-DMAP(0.1当量)に続いてジシクロヘキシルカルボジイミド-DCC(0.8当量)に溶解する。15分後、反応物是不透明になり、それを室温で一週間攪拌する。沈澱した尿素を濾過して除き、塩化メチレンで洗い、合わせた濾液の容量を当初の大きさに減らす。これを0℃に冷却し、激しく攪拌しながら無水エーテルを加えて沈澱させる。濾過後、固形物を熱無水エタノールに溶解し、再結晶させて27または28を得る(Krepinsky らによる J. Am. Chem. Soc. 113:5095、1991、suppl.material)。

炭水化物ライブラリー2の調製(図20参照)

工程1。MeOH中ライブラリー1の溶液(0.10モル)に、触媒量の $NaOCH_3$ (0.10当量)を加えて、混合物を0℃で1時間攪拌するかまたは薄層クロマトグラフィーによるラクトールの生成が完了するまで攪拌する。次に反応混合物を塩化アンモニウム(1.0モル)で反応を制止させてから、酢酸エチル(0.05モル)で希釈し、水(1×)、食塩水(1×)で洗い、濃縮する。粗化合物を次にエチルエーテルで沈澱させて濾過する。このPEG結合体を熱エタノールから結晶化させ、濾過し、冷エタノールで洗って所望の中間体ラクトールライブラリーを得る。

工程2。この中間体ラクトールライブラリーを次に0℃において塩化メチレン溶液(0.10モル)中でアセトイミデートに転化させる。この混合物を次に水素化ナトリウム(0.10モル)に曝露して、1時間攪拌した後一工程でトリクロロアセトニトリル(1.2当量)を加える。さらに1時間後に(または薄層クロマトグラフィーで反応が完了したと思われるまで)、反応混合物を重炭酸ナトリウム飽和溶液(1.0モル)で反応を制止させてから酢酸エチルで希釈して水(1×)、食塩水(1×)で洗い、硫酸マグネシウムで乾燥して、蒸発させる。エーテル中での再懸濁および沈澱に続くエタノール中での結晶化および濾過によって活性化アセトイミデートライブラリーが得られる。

(72)

特表平10-506379

工程3。塩化メチレン (0.01モル) 中、アセトイミデートライブラリー (1.0当量) および化合物11または12 (3.0当量) の冷溶液 ( $-10^{\circ}\text{C}$ ) に三フッ化ホウ素エーテル錯化合物 (3.5当量) を添加する。反応混合物を徐々に室温まで温めて一週間撹拌を続ける。この反応混合物を重炭酸ナトリウム (3.5当量) で反応を制止させ、酢酸エチルで希釈し、水 (1 $\times$ )、食塩水 (1 $\times$ ) で洗い、硫酸マグネシウムで乾燥して、蒸発させる。エーテル中での再懸濁および沈殿に続くエタノール中での結晶化および濾過により所望のライブラリー2が得られる。2種類の糖類とPEG担体とのカップリングに関する関連技術についてはKrepinskyらの J. Am. Chem. Soc., Suppl. material、113:5095、1991参照のこと。

PEG担体を用いる分割合成法。

合成の各段階後、各PEG担持ライブラリーの一部を保留してカタログを作り、残りの部分は一緒にし、混合して再分割する。(i) カップリング、(ii) 保留およびカタログ作り、ならびに (iii) 無作為抽出、を所望のライブラリーが得られるまで繰返す。この帰納的デコンボリューション法についての総説は Janda, K. らの Proc. Natl. Acad. Sci. 91:11422、1994を参照のこと。炭水化物ライブラリー3の調製 (図21参照)。

工程1。MeOH中予め無作為化したライブラリー2の溶液 (0.10モル) に触媒量のNaOCH<sub>3</sub> (0.10当量) を加え、その混合物を、 $0^{\circ}\text{C}$  で1時間撹拌するか、または薄層クロマトグラフィーによりラクトール生成が完了するまで撹拌する。次に反応混合物を塩化アンモニウム (1.0モル) で反応を制止させてから、酢酸エチル (0.05M) で希釈して、水 (1 $\times$ )、食塩水 (1 $\times$ ) で洗って濃縮する。次に粗化合物をエチルエーテルで沈殿させて濾過する。このPEG結合体を熱エタノールから結晶化させ、濾過し、冷エタノールで洗って、所望の中間体ラクトールライブラリーを得る。

工程2。この中間体ラクトールライブラリーを次に、 $0^{\circ}\text{C}$  で塩化メチレン

(0.10モル) 溶液中でアセトイミデートに転化させる。次にこの混合物を水素化ナトリウム (1.2当量) に曝露して1時間撹拌した後一工程でトリクロロ

(73)

特表平10-506379

アセトニトリル (1.2 当量) を加える。さらに1時間後に (または薄層クロマトグラフィーで反応が完了したと思われるまで)、反応混合物を重炭酸ナトリウム飽和溶液 (1.0 モル) で反応を制止させてから、酢酸エチルで希釈し、水 (1×)、食塩水 (1×) で洗い、硫酸マグネシウムで乾燥して、蒸発させる。エーテル中での再懸濁および沈殿に続くエタノール中での結晶化および濾過によって活性化アセトイミデートライブラリーを得る。

工程3。塩化メチレン (0.01 モル) 中アセトイミデートライブラリー (1.0 当量) および化合物23または24 (3.0 当量) の冷溶液 ( $-10^{\circ}\text{C}$ ) に、三フッ化ホウ素エーテル錯化合物 (3.5 当量) を加える。反応混合物を徐々に室温まで温め、攪拌を一夜間続ける。次に反応混合物を重炭酸ナトリウム (3.5 当量) で反応を制止させ、酢酸エチルで希釈し、水 (1×)、食塩水 (1×) で洗い、硫酸マグネシウムで乾燥して、蒸発させる。エーテル中での再懸濁および沈殿に続くエタノール中での結晶化および濾過によって所望のライブラリー-3を得る。2種の糖類とPEG担体とのカップリングに関する関連技術については Krepin-sky らの J. Am. Chem. Soc., Suppl. material、113:5095、1991を参照のこと。

PEG担体を用いる分割合成法。

合成の各段階後、各PEG担持ライブラリーの一部を保留してカタログを作り残りの部分は一緒にして、混合して再分割する。(i) カップリング、(ii) 保留およびカタログ作りならびに (iii) 無作為抽出を所望のライブラリーが得られるまで繰返す。この帰納的デコンボリューション法に関する総説については Janda, K. らの Proc. Natl. Acad. Sci. 91:11422、1994を参照のこと。

炭水化物ライブラリー4または5の調製 (図22および図23参照)。

工程1。MeOH中のライブラリー3の画分 (0.10 モル) に触媒量のN

aOCH<sub>3</sub> (0.10 当量) を加えて、混合物を、 $0^{\circ}\text{C}$  で1時間または薄層クロマトグラフィーによりラクトールの生成が完了するまで攪拌する。次に反応混合物を塩化アンモニウム (1.0 モル) で反応を制止させてから、酢酸エチル (0

(74)

特表平10-506379

．05モル)で希釈し、水(1×)、食塩水(1×)で洗って濃縮する。粗化合物は次にエチルエーテルで沈澱させて濾過する。PEG結合体は熱エタノールから結晶化させ、濾過して、冷エタノールで洗い、所望の中間体ラクトールライブラリーを得る。

工程2。この中間体ラクトールライブラリーを、次に0℃で塩化メチレン溶液(0.10モル)中でアセトイミデートに変える。この混合物を次に水素化ナトリウム(1.2当量)に曝露して1時間攪拌してからトリクロロアセトニトリル(1.2当量)を一工程で加える。さらに1時間後(または薄層クロマトグラフィーで反応が完了したように思われるとき)反応混合物を重炭酸ナトリウム飽和溶液(1.0モル)で反応を制止させた後酢酸エチルで希釈し、水(1×)、食塩水(1×)で洗い、硫酸マグネシウムで乾燥してから蒸発させる。エーテル中での再懸濁および沈澱に続くエタノール中での結晶化および濾過によって活性化アセトイミデートライブラリーを得る。

工程3。塩化メチレン(0.01モル)中アセトイミデートライブラリー(1.0当量)および化合物11または12(3.0当量)の冷溶液(-10℃)に、三フッ化ホウ素エーテル錯化合物(3.5当量)を加える。この反応混合物を徐々に室温まで温め、一夜間攪拌を続ける。この反応混合物は次に重炭酸ナトリウム(3.5当量)で反応を制止させ、酢酸エチルで希釈して、水(1×)、食塩水(1×)で洗い、硫酸マグネシウムで乾燥してから蒸発させる。エーテル中での再懸濁および沈澱に続くエタノール中での結晶化および濾過によって所望ライブラリー4または5が得られる。2種の糖類とPEG担体とのカップリングに関する関連技術はKrepinskyらのJ. Am. Chem. Soc., Suppl. material、113:5095、1991を参照のこと。

脱保護ライブラリー4または5の調製。

乾燥エタノール(0.10モル)中ベンジルで保護したライブラリー4または

5(1.0当量)の溶液に、10%Pd/C(0.2当量)を加える。この反応混合物を水素バルーンでキャップしてから1日間25℃で攪拌する。完了時に、コットンの栓、0.5cm(長さ)の砂、5cmのシリカ、1cmのシーライトをこの

(75)

特表平10-506379

順に詰めた直径5 cmのカラムに反応物を通して残留炭素を除く。次にカラムを酢酸エチルで4回フラッシュして溶剤を蒸発させる。必要ならば、エーテル中での再懸濁および沈殿に続くエタノール中での結晶化および濾過によって、この化合物をさらに精製して所望の脱保護（脱ベンジル化）ライブラリー4または5を得る。

PEG担体からのオリゴ糖の開裂。

25℃で攪拌しながら、塩化メチレン（0.5モル）に溶解したライブラリー5（たとえば化合物200、図24参照）とメタノール（2.0モル）および1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデセ-7-エン（DBU（ライブラリー0.02ミリモル当り1滴））との一夜間の処理によってポリマーからオリゴ糖部分を除去する。PEG担体と脱保護オリゴ糖ライブラリーは次にエーテルで沈殿させ、濾過して除去する。PEGおよびオリゴ糖ライブラリーの両方を含む沈殿は熱エタノールに溶解し、PEGを結晶化させ、濾過して、冷エタノールで洗う。濾液と洗液を一緒にした後蒸発させて、完全に脱保護したオリゴ糖300を対応する脱保護ライブラリー5とともに得、標準の逆相HPLC分析法により、これをさらに精製することができる。PEG担体とオリゴ糖に関する関連技術についてはKrepinskyらの J. Am. Chem. Soc. suppl. material 113:5095、1991を参照のこと。

コアヌクレオチドの保護。

ヌクレオチドは一般の保護基で保護されるように見える。5'-水酸基の場合には、酸性の不安定性のために、DMTr（ジメトキシトリチル）基が好ましい保護基である。代りのものとしては、9-フェニルキサンテン-9-イル（ピキシル）基が完全に容認できるものであり、かつBeaucageらが Tetrahedron 12:2233、1992で検討した補足的な結晶化度のみならず他のものをもち

た。標準のベンゾイルおよびイソブチリル基は、それぞれ2'-デオキシシチジンならびに2'-デオキシグアノシンのN<sup>4</sup>およびN<sup>2</sup>-環外アミノ基の保護に用いられる。ジ-n-ブチルアミノメチレンまたは標準のベンゾイル基はアデニンのN<sup>6</sup>位に用いることができ、長さが少なくとも20個の塩基の合成のほと

(76)

特表平10-506379

んどに良好な結果を示す。

5'-O-DMT-N-3' OPEGの調製。

エーテルおよびアミド結合のような他の官能性もPEG可溶性担体とヌクレオチドコア分子とのリンカーとして適しているけれども、この保護5'-O-ヌクレオチドは、スクシニル結合を介して、PEG(好ましくはそのモノメチルエーテル、分子量5000、ヒドロキシル価 0.20ミリ当量/グラム、Aldrich、Fluka または Sigma chemical company)とカップルさせる。ヌクレオチドとのモノメチルエーテル-PEGスクシネートのカップリングは、Keekら (J. Org. Chem. 50:2394, 1985)により開発されたようなDCC条件を用いる標準の活性化エステル法によって行われる。可溶性担体を5'-O位に結合させる別法としては、Napoliら (Nucleoside and Nucleotide, 12:21-30, 1993)によって示されたようにアミド官能性を介して、アデニン、グアニンおよびシトシンの環外アミン基をPEGに結合させることができる。

手順は次の通りである。保護アミノ酸(1.0当量)、無水コハク酸(5当量)およびDMAP(1当量)を室温下で乾燥ピリジン(0.20モル)中で攪拌する。反応完了後、ピリジンを蒸発させて除去し、残留物を酢酸エチル中でフラッシュクロマトグラフィーにかける。次にPEGのモノメチルエーテル(0.8当量)を3-O-ヘミスクシネートと混合し、乾燥剤五酸化リン(P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)を用い高真空で一週間乾燥する。次にこの混合物を無水塩化メチレン(0.5モル)および触媒量のジメチルアミノピリジン-DMAP(0.1当量)、続いてジシクロヘキシルカルボジイミド-DCC(0.8当量)と溶解する。15分後、反応物は不透明になり、それを室温で一週間攪拌する。沈澱した尿素を濾別し、塩化メチレンで洗い、濾液を合せて、その容積を当初の大きさまで減少させる。それを0℃に冷却し、激しく攪拌しながら無水エーテルを加えて、沈澱させる。濾

過後、固形分を熱無水アルコールに溶解し、再結晶させて、27または28を得る(Krepinskyらの J. Am. Chem. Soc. 113:5095, 1991, supplementary materials)。

PEGの代替品。



(77)

特表平10-506379

PEG (ポリエチレングリコール) は、沈澱しやすさおよび結晶性の点から、すぐれた可溶性担体であるけれども、別の高分子基を用いることもでき、その中にはポリビニルアルコールおよびポリビニルピロリドンと共重合したポリビニルアミンがある (Bayerら、Nature 237:512、1972)。

連鎖集合工程(chain assembly step) 1-2

標準条件 (Gaitら、Oligonucleotide synthesis a practical approach IRL Press Ltd、Oxford、1984 pg 83-115) を用い、1サイクル当り2つの化学反応を含む循環プロセスにおいて、3' 末端から5' 末端にオリゴデオキシリボヌクレオチドを合成する。第1工程は適当なプロトン性酸 (たとえば1, 2-ジクロロエタン中3%-10% (w/v) ジクロロ酢酸溶液) で5' 保護基 (DMTr または Px) を除き、次いで適切な洗浄で残留酸を除いてPEG 結合体を沈澱または結晶化 (必要ならば) させる。次に適当に保護したホスホリアルミダイト、ホスフィットまたはホスホトリエステルヌクレオチド (使用するモノマーは選択するカップリング法による) を、カップリング剤 (たとえば1-メチレンスルホニル-3-ニトロ-1, 2, 4-トリアゾール (もしも必要ならば) ; 選択するカップリング法による) の存在下で、PEG 担体に結合したデオキシリボヌクレオチドの遊離5' -水酸基と縮合させる。試薬を完全に除くために、PEG-結合配列を、塩化メチレン/ジエチルエーテルまたはエチルアルコールからさらに再結晶させることができる。PEG-5000モノメチルエーテル沈澱物は少なくともオクタマーのレベルまでは (試験した最大の長さ) 純粋で、容易に濾過可能と報告されている (Bonoraら、Nucleosides and Nucleotides、10:269、1991)。注: PEG-結合オリゴマーの精製は脱トリチル化工程以前にキャンピング混合物 (たとえば無水酢酸) との処理によって増進させることができる。

PEG担体とヌクレオチドとを用いる分割合成法。

合成の各工程後に、PEG担持ライブラリーのそれぞれの一部を、保留してカタログを作り、残りの部分は一緒にし、混合して、再分割する。(1-2) 脱保護、カップリング、(3) 保留およびカタログ作りならびに(4) 無作為抽出の

(78)

特表平10-506379

工程を所望のライブラリーが得られるまで繰返す。この帰納的デコンボリューション法に関する総説については、Janda, K. らの Proc. Natl. Acad. Sci., 91: 11422, 1994 を参照のこと。

精製、酸化、脱保護工程 3-6。

ホスフィットまたはホスホルアミダイトのホスフェートへの酸化。

ホスフィット類の酸化は、0.2モルのヨウ素(1.1当量)含有テトラヒドロフラン-2, 6-ルチジン-水(2:1:1)溶液(総濃度0.1モル)中で25℃、10分間標準条件で行われる。この混合物は次に重硫酸ナトリウム飽和溶液で洗って残留ヨウ素を除去し(1×)、重炭酸ナトリウム飽和溶液で洗って残留塩基を除去し(1×)、かつ食塩飽和溶液で洗い、エーテルで希釈してPEGポリマーを沈澱させる。次の熱エタノール中での再結晶化に続く冷エタノール洗浄によって所望のホスフェートを得る。ポリマー担体上のデオキシオリゴヌクレオチドの合成を概説する標準方法については Caruthers ら、J. Am. Chem. Soc. 103: 3185-3191, 1981; Gait らの Oligonucleotide synthesis, a practical approach IRL Press Ltd, Oxford, Chapt. 4, 83, 1984 を参照のこと。

N<sup>2</sup>, N<sup>4</sup>, N<sup>6</sup>および5' 保護基の除去。

2'-デオキシシチジンならびに2'-デオキシグアノシンのN<sup>4</sup>およびN<sup>2</sup>-環外アミノ基、ならびにアデニンのN<sup>6</sup>位のジ-n-ブチルアミノメチレン基の脱保護については、ベンゾイルおよびイソブチリル基と約60℃で15-20時間加熱する標準法が用いられる。

5' DMT保護基を用いる場合には、ニトロメタン(0.1モル)中ZnBr<sub>2</sub>

(1.5当量)の飽和溶液でPEG結合オリゴヌクレオチドを処理することによって該保護基を除去することができる。次の工程は、テトラヒドロフランおよび2, 6-ルチジン中でn-ブタノールによる加水分解洗浄である(試薬はすべてAldrich chemical company から入手可能)。あるいはまた、80%酢酸を用いることができる。したがってPEG担体の結晶化は精製5' 脱保護オリゴヌクレオチドをもたらす。

(79)

特表平10-506379

オリゴヌクレオチドからPEGを除くためのコハク酸エステルの開裂。

塩化メチレンに溶解したライブラリー（0.5モル）とメタノール（2.0モル）および1,8-ジアザビシクロ〔5.4.0〕ウンデセ-7-エン（DBU（ライブラリー0.02ミリモル当り1滴）とを25℃で攪拌しながら一週間処理することによって該ポリマーからオリゴヌクレオチド部分が除かれる。このPEG担体と脱保護オリゴヌクレオチドライブラリーは次にエーテルで沈殿させて濾過して除去する。PEGおよびオリゴヌクレオチドライブラリーの両方を含む沈殿を熱エタノールに溶解し、PEGを結晶化させ、濾過して、冷エタノールで洗う。次に濾過と洗液を一緒にして蒸発させて完全な脱保護オリゴヌクレオチドライブラリーを得、標準の逆相HPLC分析法またはイオン交換クロマトグラフィーでそれをさらに精製することができる。PEG担体に関する関連技術については Bonoraらの Nucleosides and Nucleotides, 12:21, 1993を参照のこと。

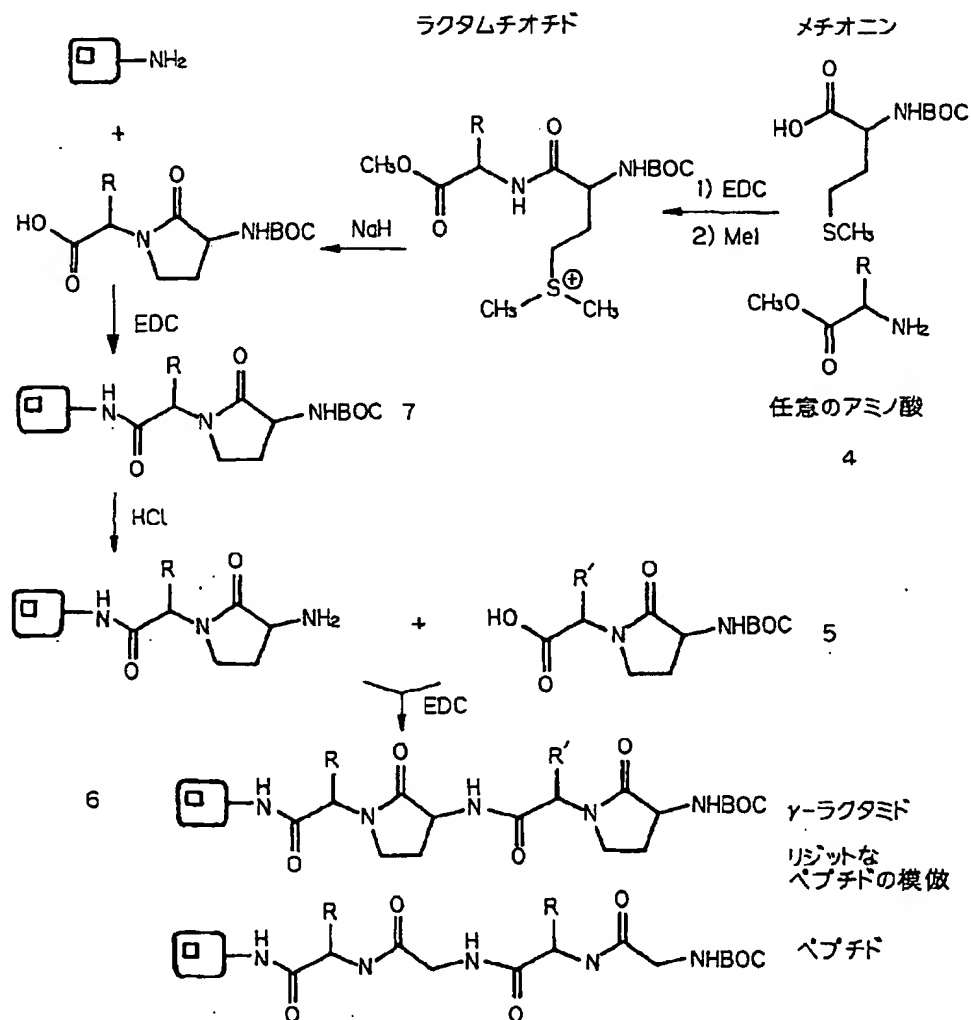


(81)

特表平10-506379

【図2】

FIG. 2

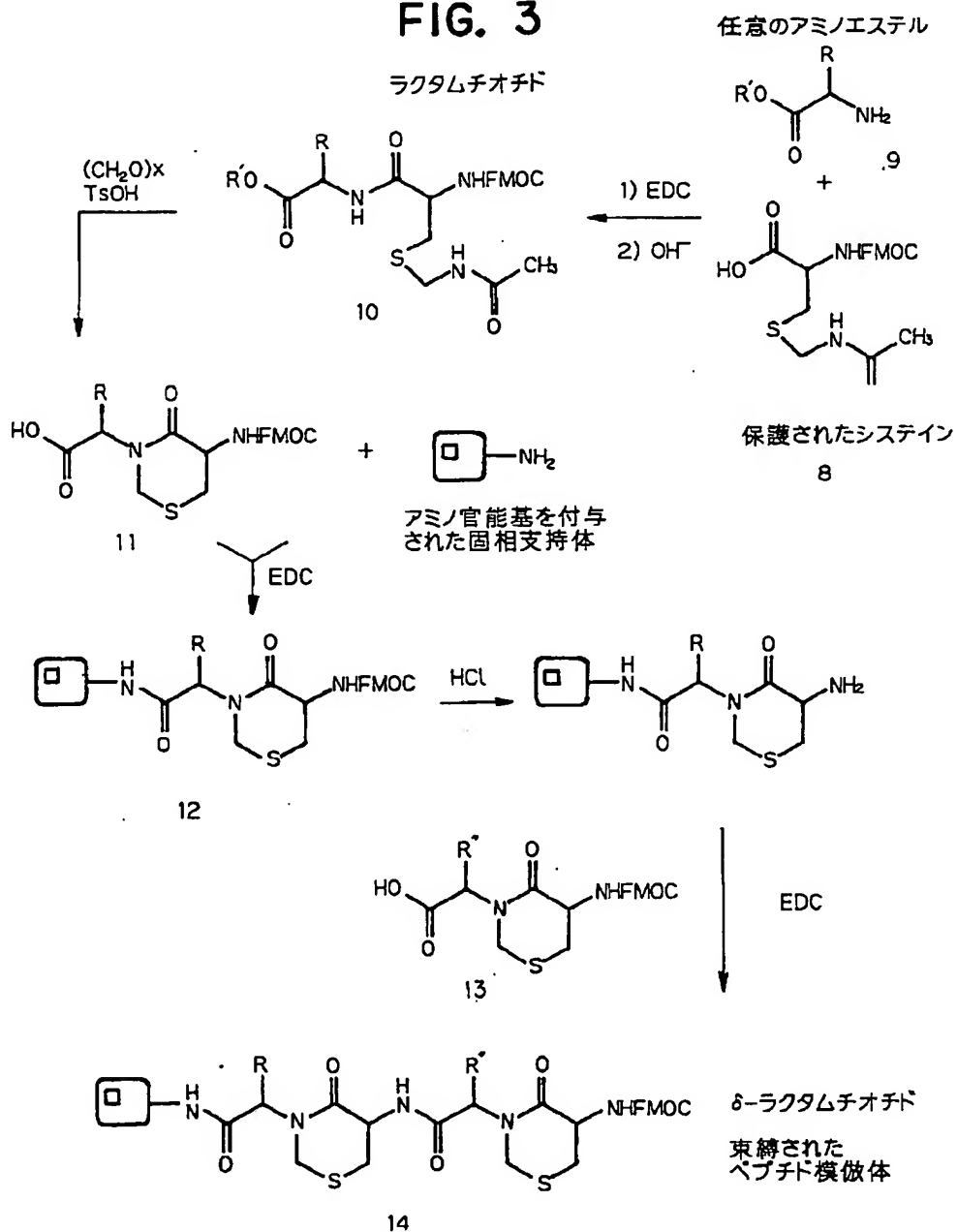


(82)

特表平10-506379

【図3】

FIG. 3

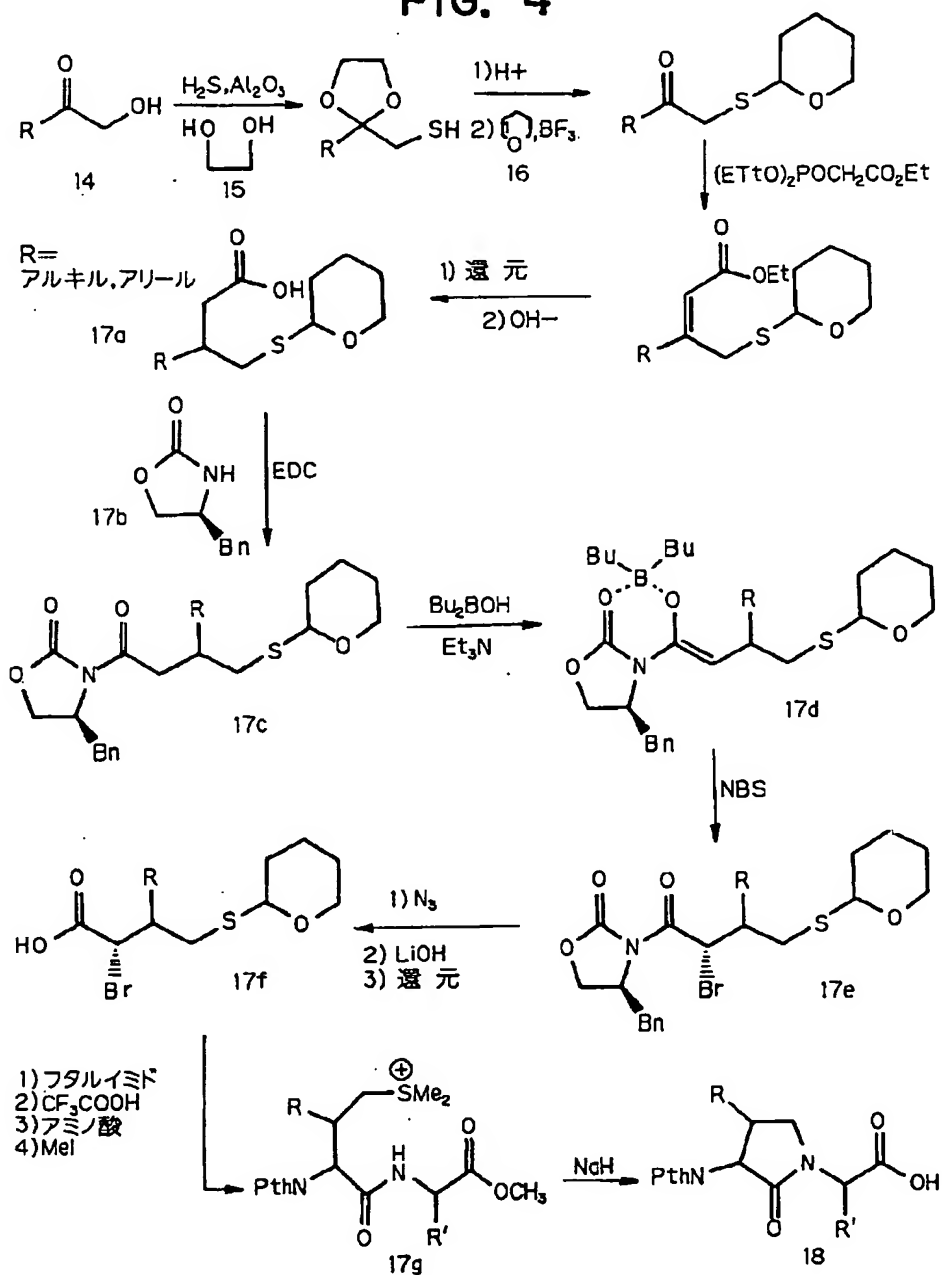


(83)

特表平10-506379

【図 4】

**FIG. 4**

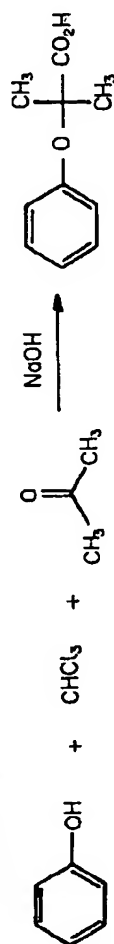


【図 5】

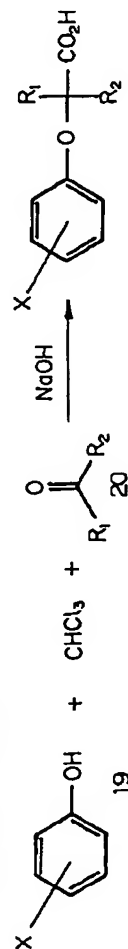
## FIG. 5

アリールオキシ酢酸ライブラリー

具体的合成実施例：



ライブラリーの生成：



21

特表平10-506379

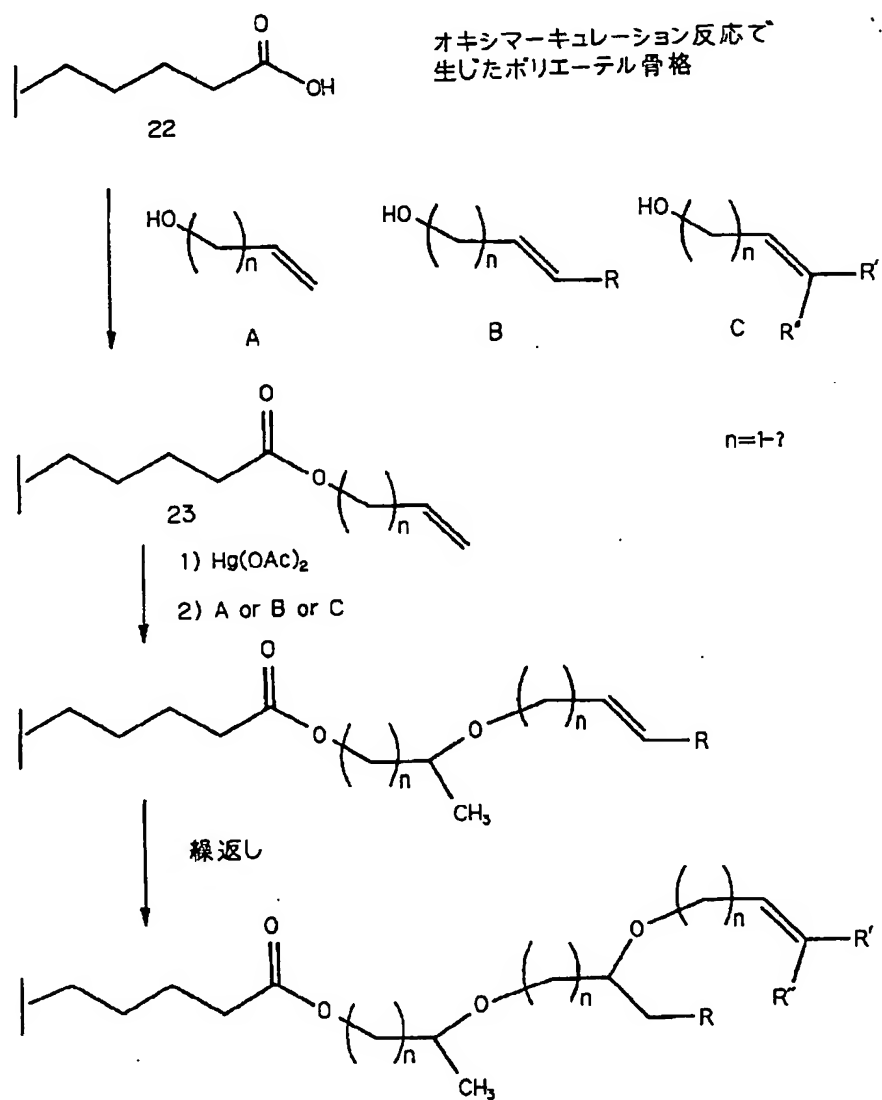


(85)

特表平10-506379

【図6】

FIG. 6



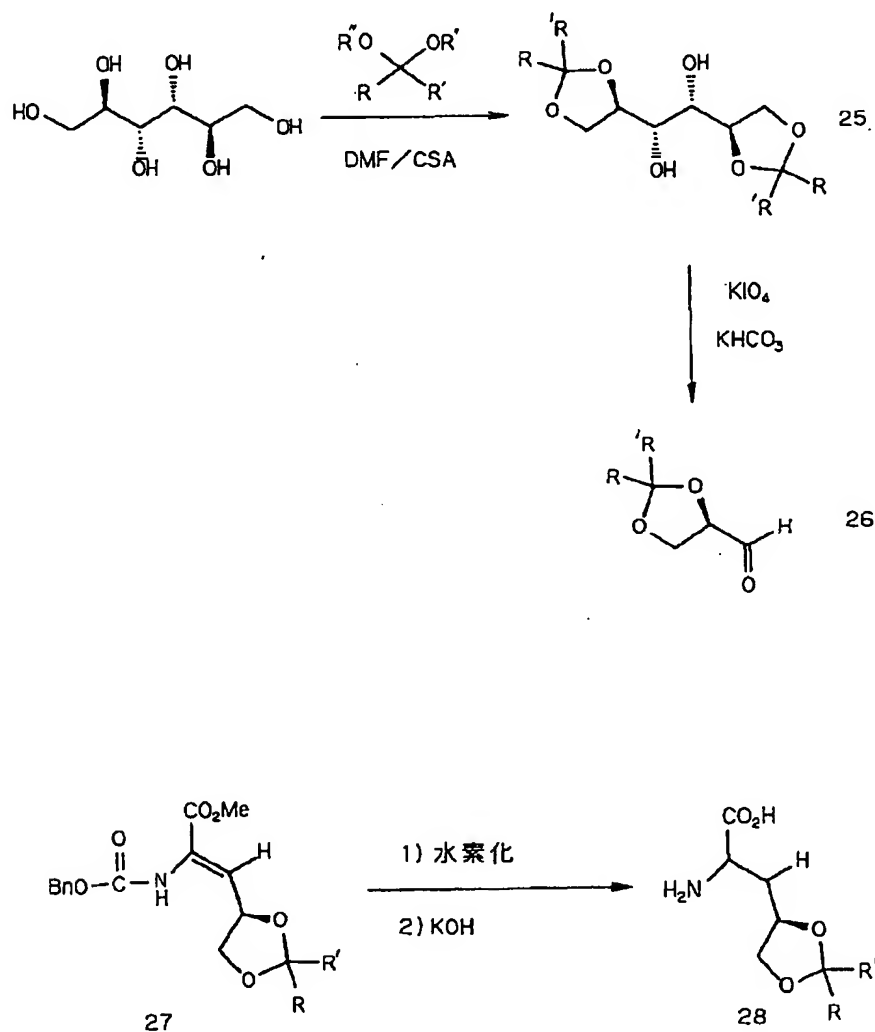
(86)

特表平10-506379

【図7】

## FIG. 7

高度に酸素化されたアミノ酸の生成

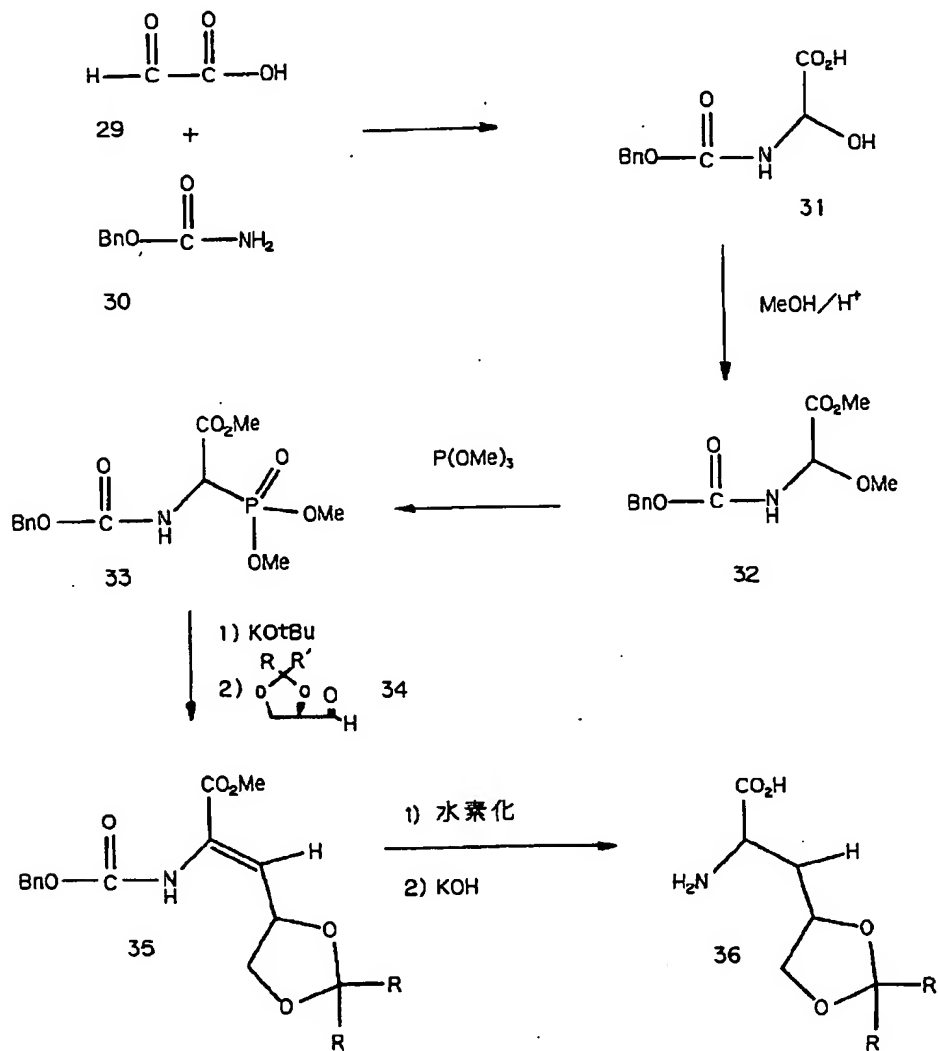


(87)

特表平10-506379

【図8】

## FIG. 8

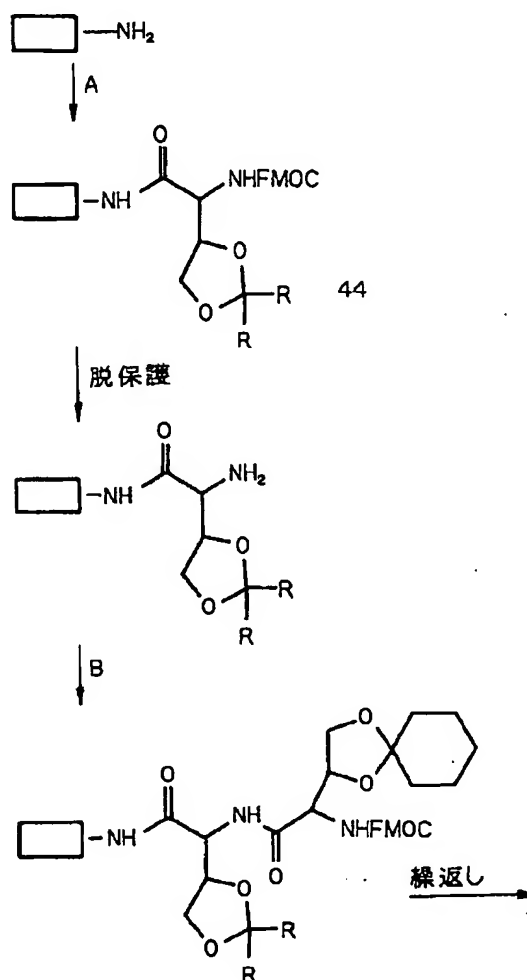
デヒドロアミノエステル中間体を経由する  
アミノ酸の生成の合成戦略

(88)

特表平10-506379

【図9】

FIG. 9



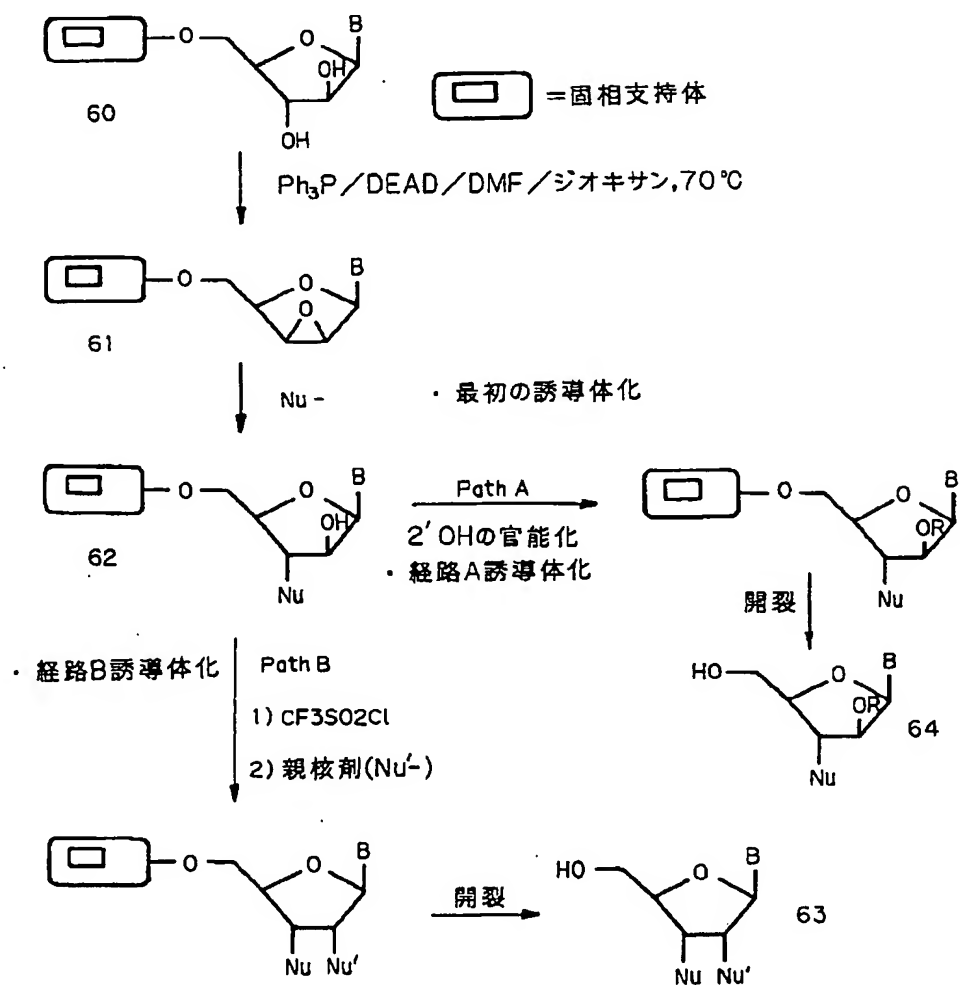


(90)

特表平10-506379

【図11】

FIG. 11

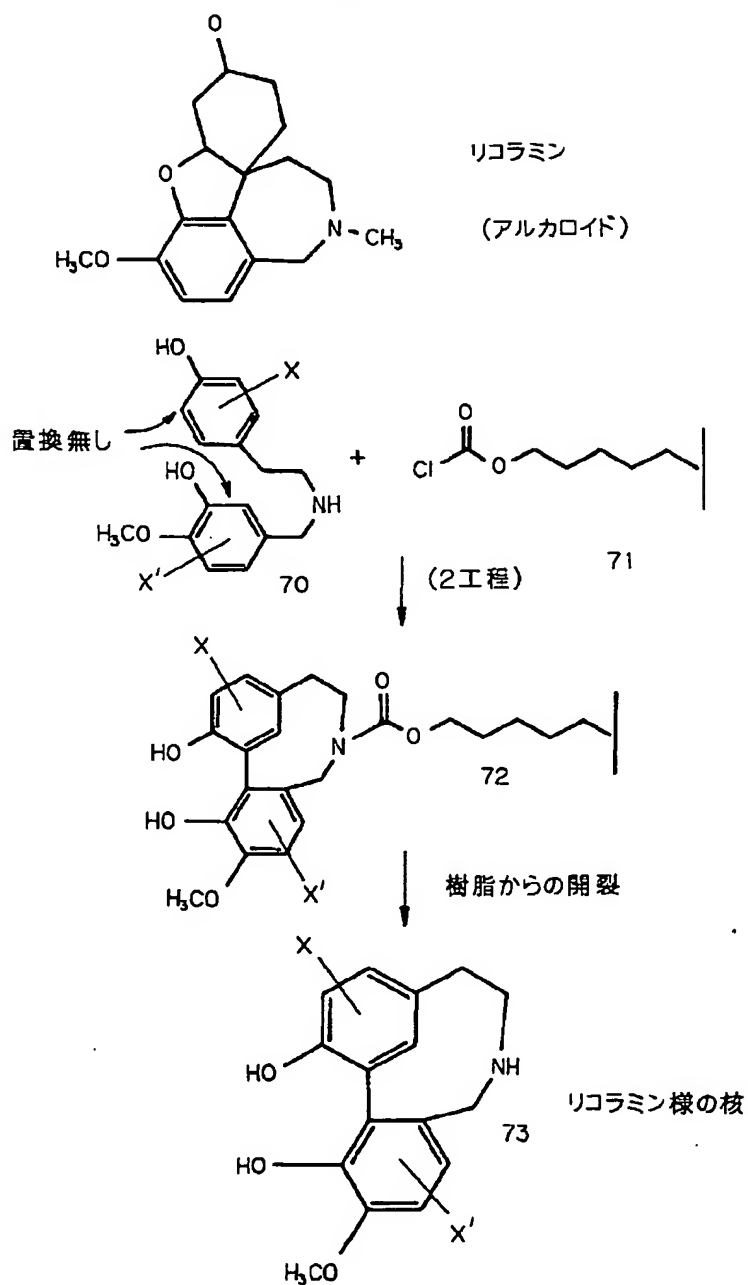


(91)

特表平10-506379

【図12】

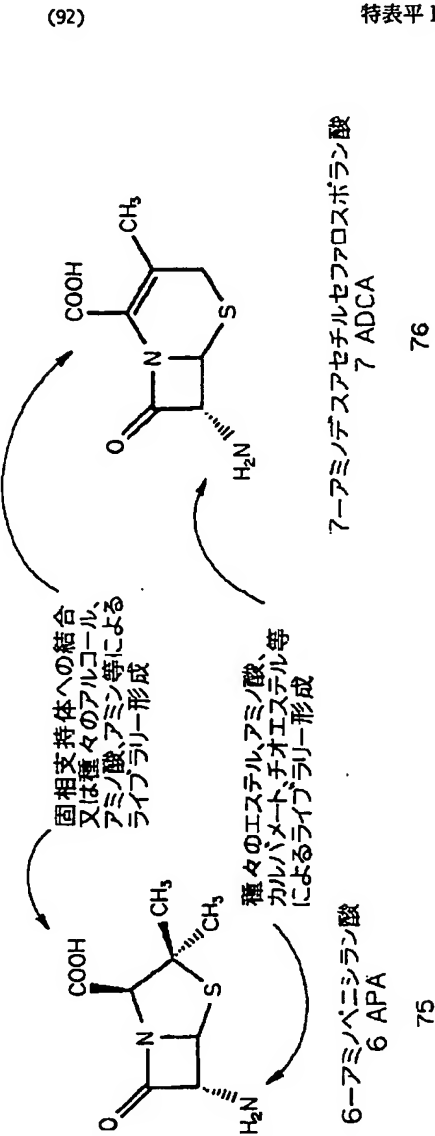
FIG. 12



【図 13】

FIG. 13

市販品として入手可能なβ-ラクタムコア分子からの  
β-ラクタム抗生物質のライブラリーの調製





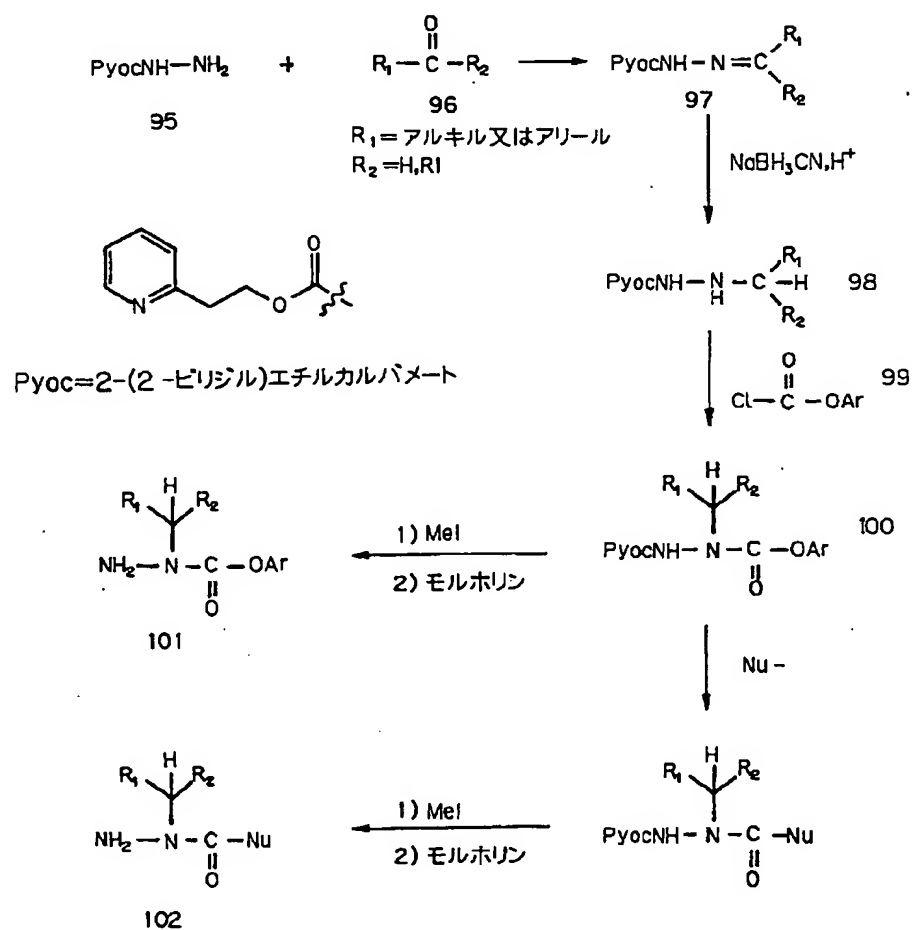
(93)

特表平10-506379

【図14】

## FIG. 14

アザアミノ酸モノマーの形成



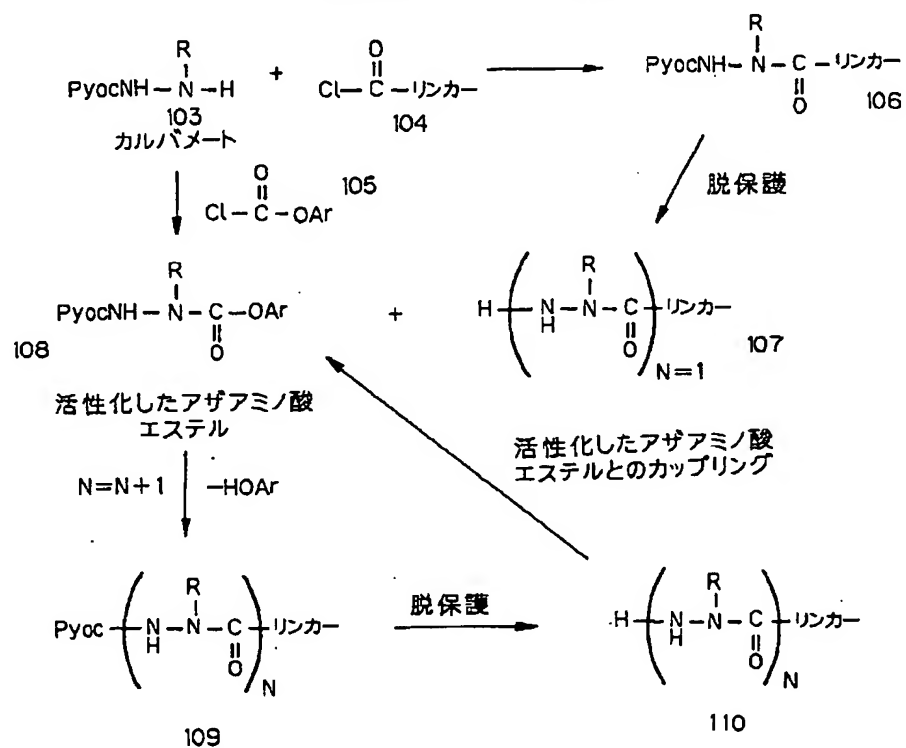
(94)

特表平10-506379

【図15】

FIG. 15

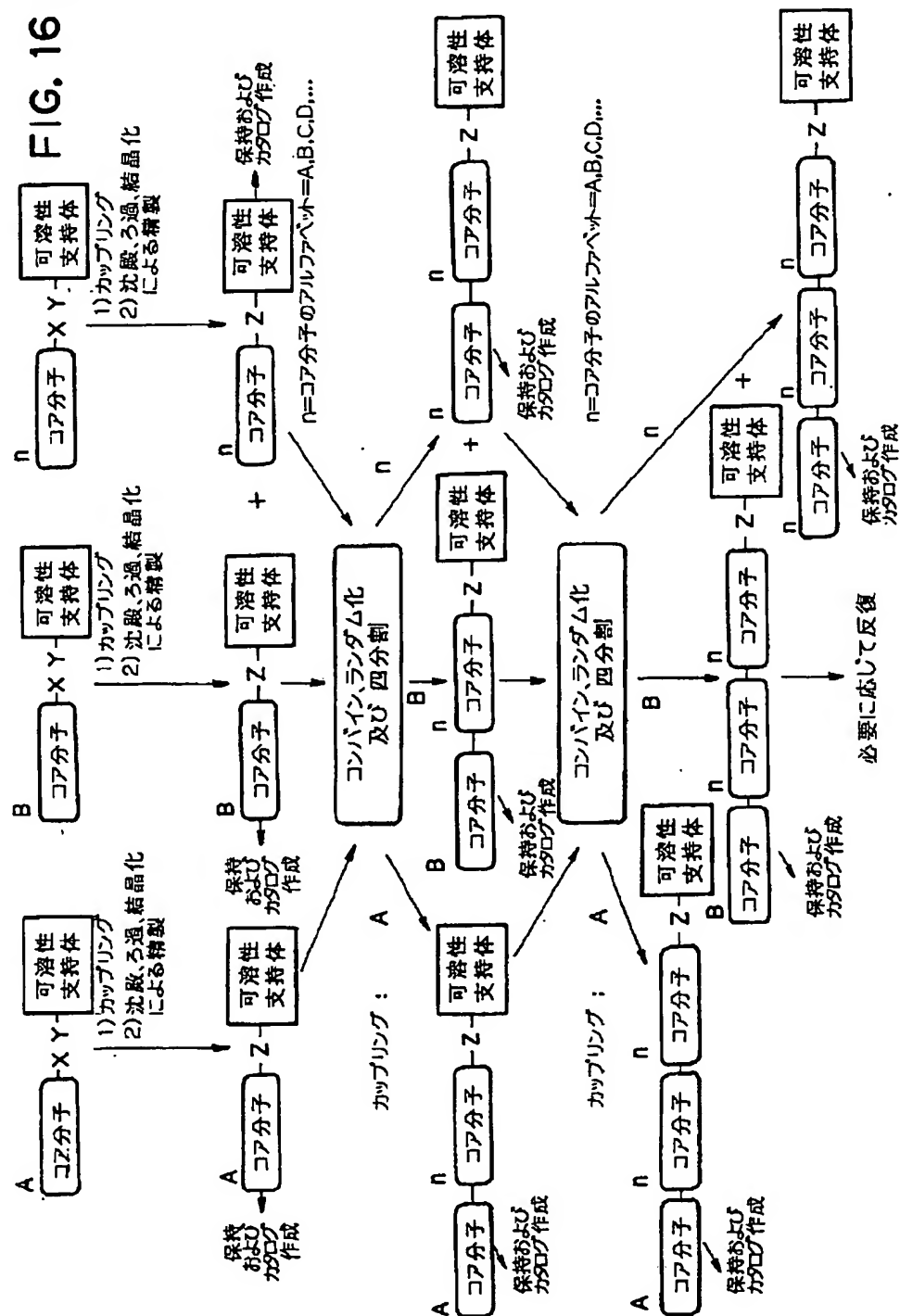
純粋なアザペプチドの形成



(95)

特表平10-506379

【図16】

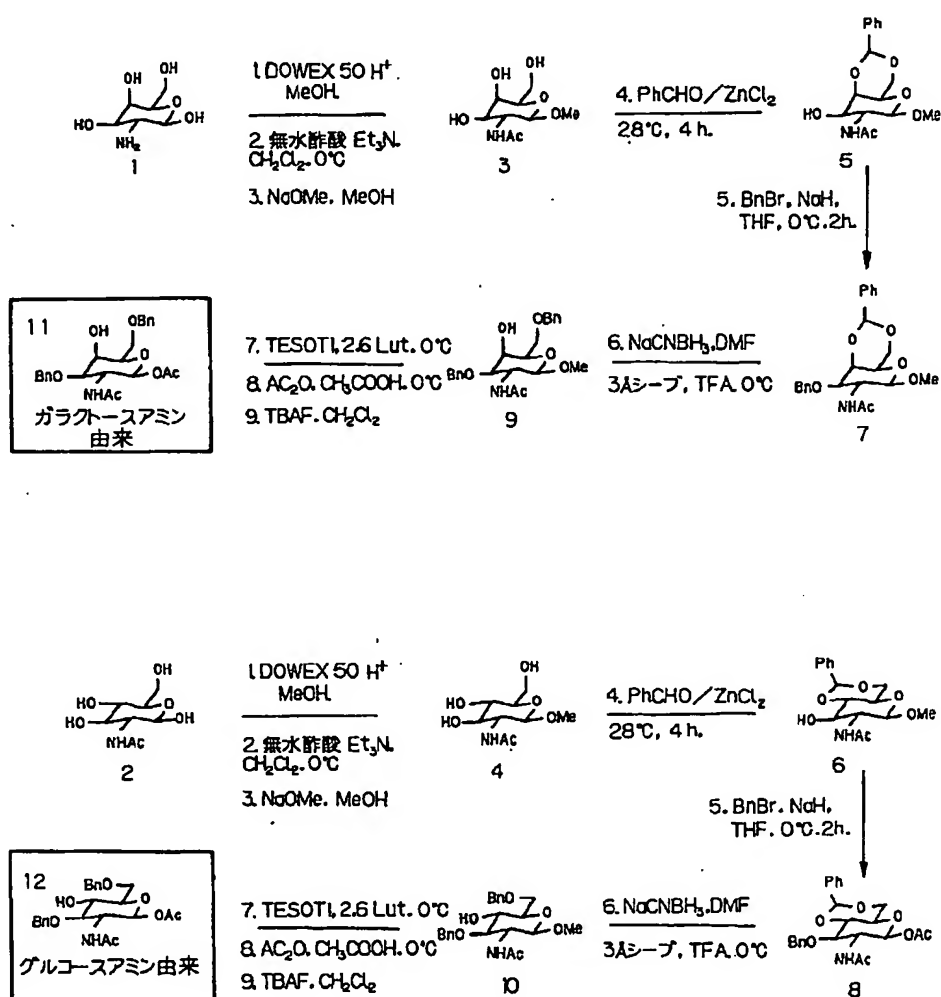


(96)

特表平10-506379

【図17】

FIG. 17

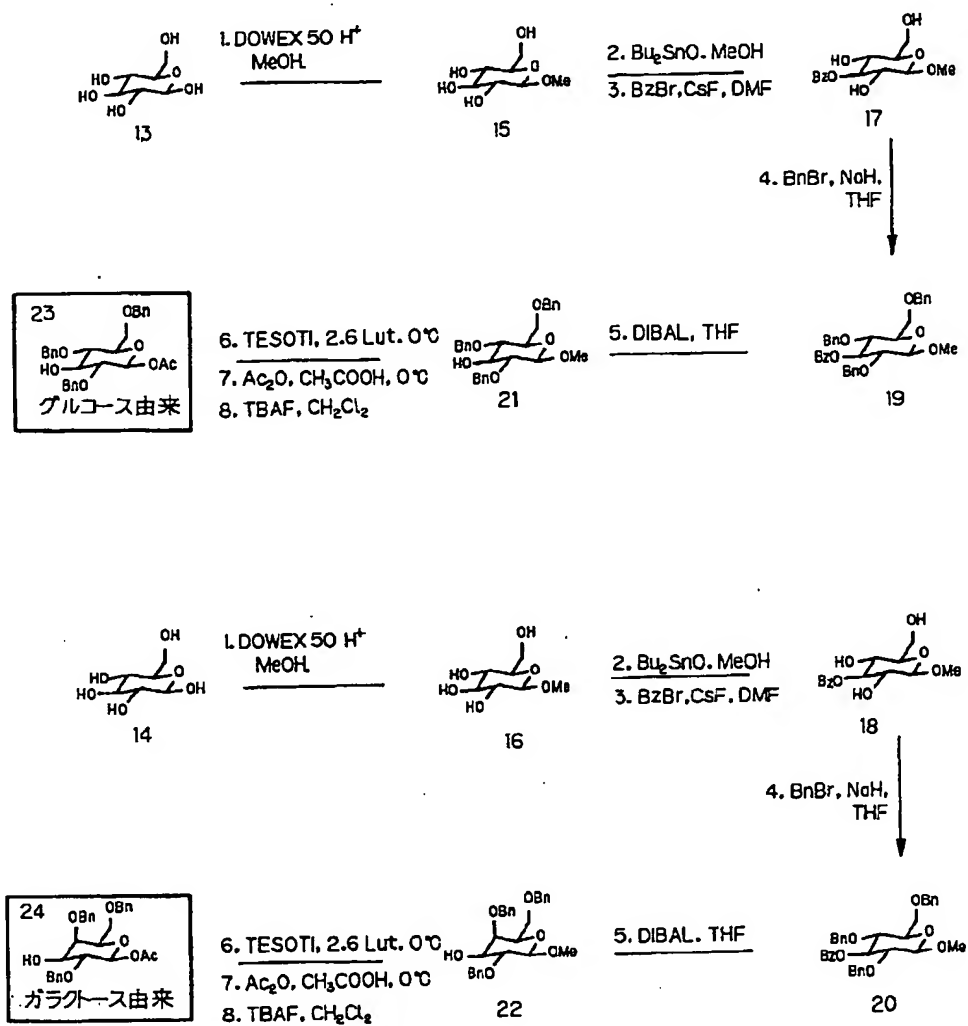


(97)

特表平10-506379

【図18】

FIG. 18

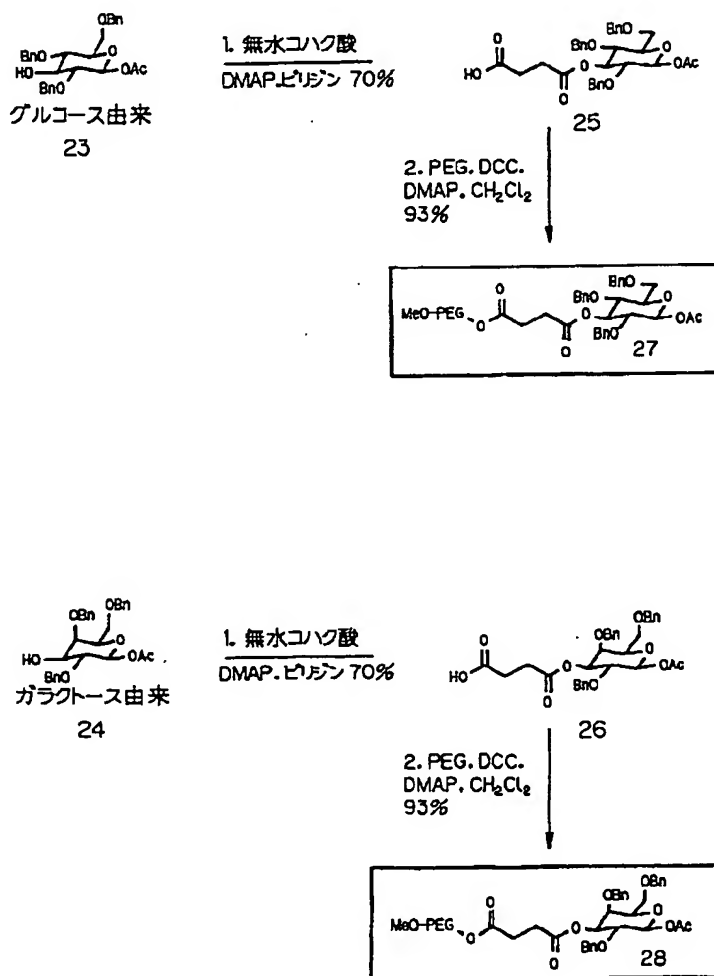


(98)

特表平10-506379

【図19】

FIG. 19



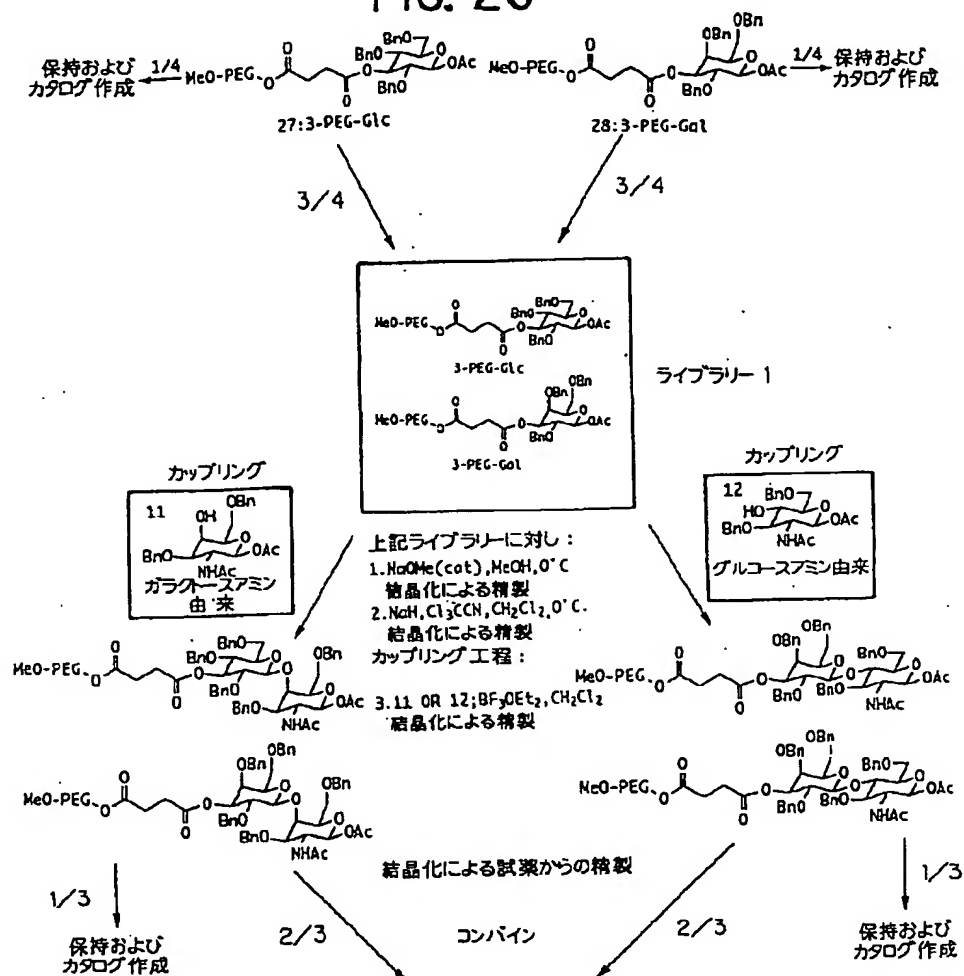
コア分子へのPEG支持体の結合

(99)

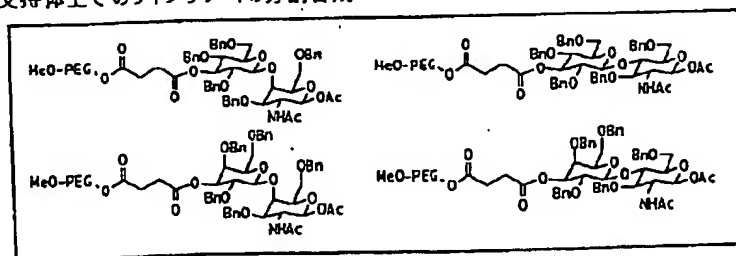
特表平10-506379

【図20】

FIG. 20



スキム 5: PEG支持体上でのライブラリー 1 の分割合成

ライブラリー 2 Z<sup>2</sup>=4化合物: ランダム化および半分づつへ分割

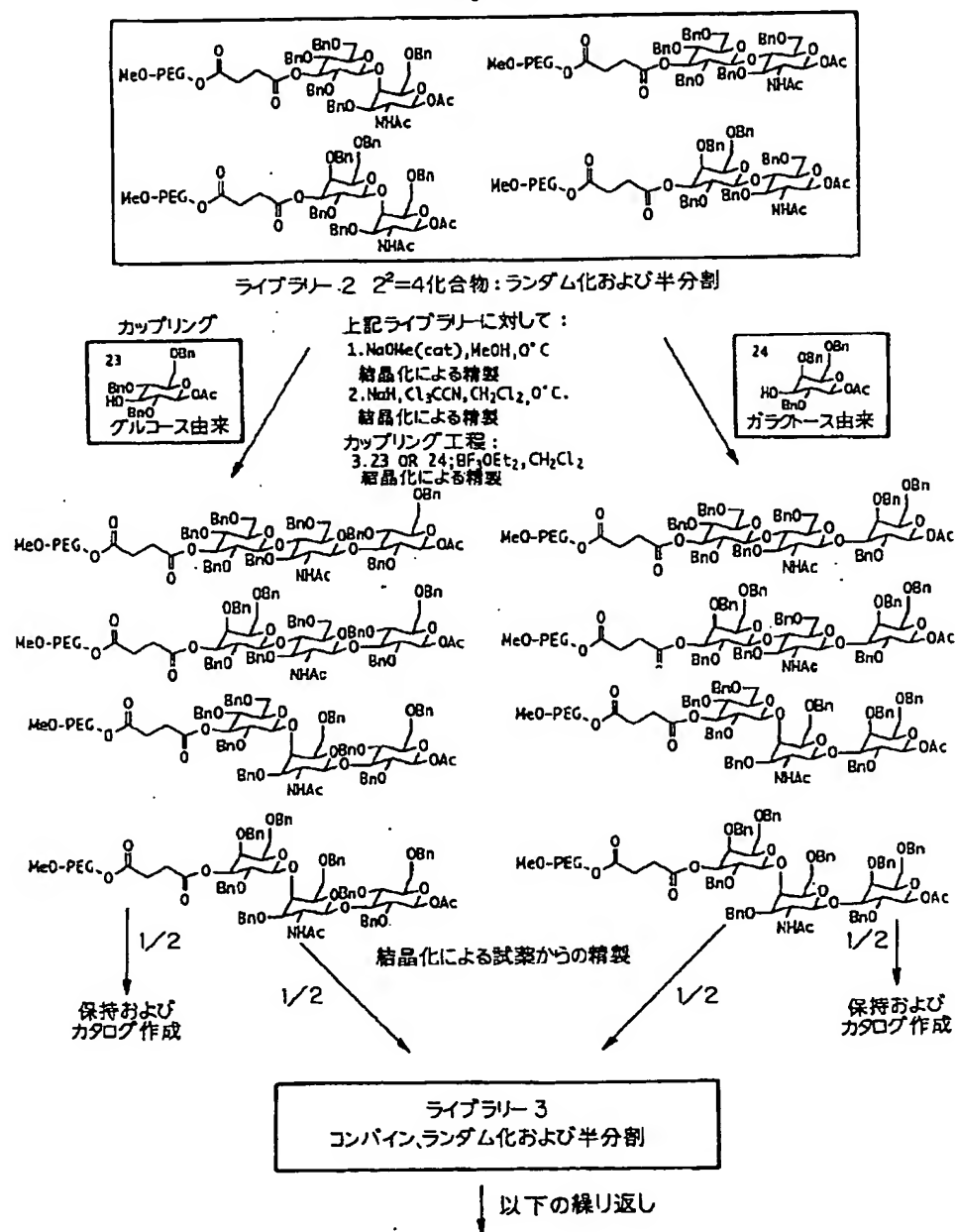
PEG支持体によるライブラリー 1 の分割合成

(100)

特表平10-506379

【図21】

FIG. 21



PEG支持体によるライブラリー 2 の分割合成

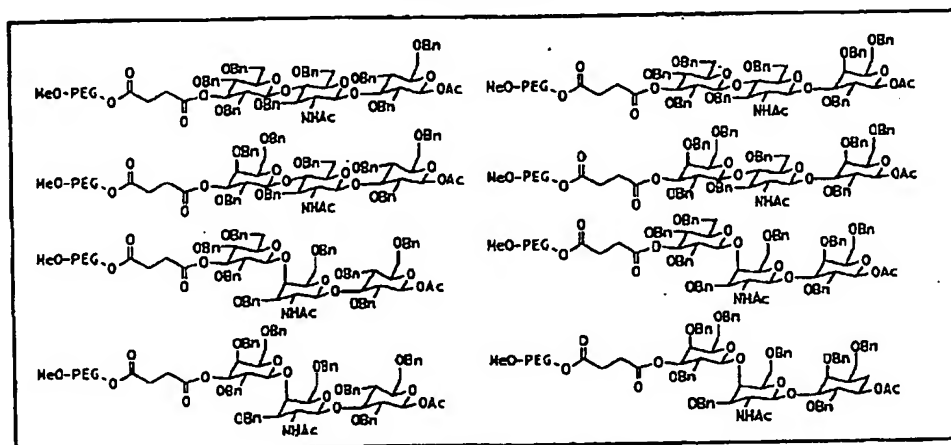


(101)

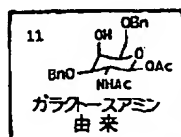
特表平10-506379

【図22】

FIG. 22

ライブラリー 3  $2^3=8$ 化合物 - フラクシオン 1

カップリング



上記ライブラリーに対し：

1. NaOMe(cat), MeOH, 0°C

結晶化による精製

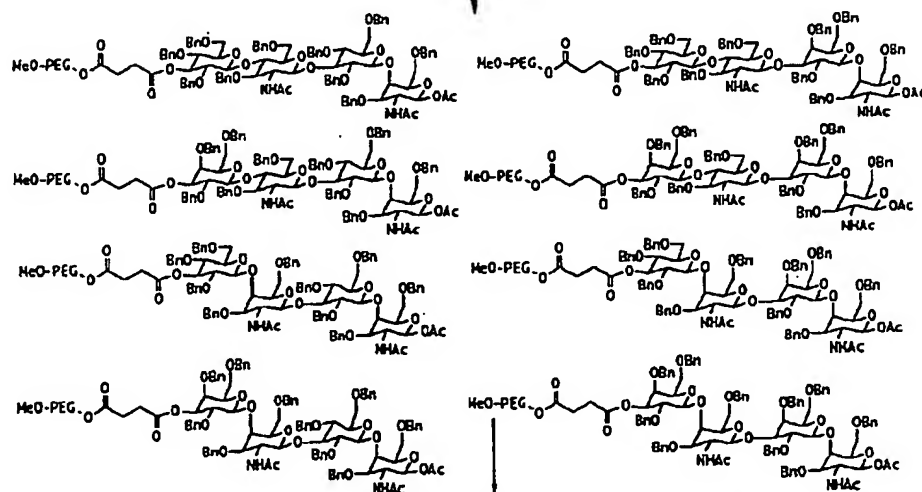
2. NaH, Cl<sub>3</sub>COH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C.

結晶化による精製

カップリング工程：

3. 11; BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

結晶化による精製



ライブラリー 4

結晶化による試薬からの精製

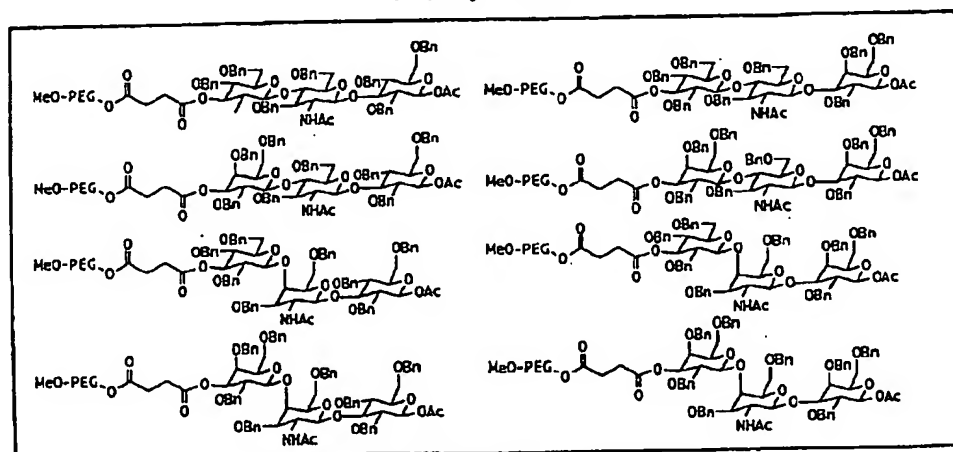
PEG支持体によるライブラリー 3 の分割合成

(102)

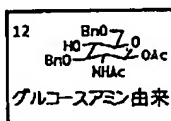
特表平10-506379

【図23】

FIG. 23

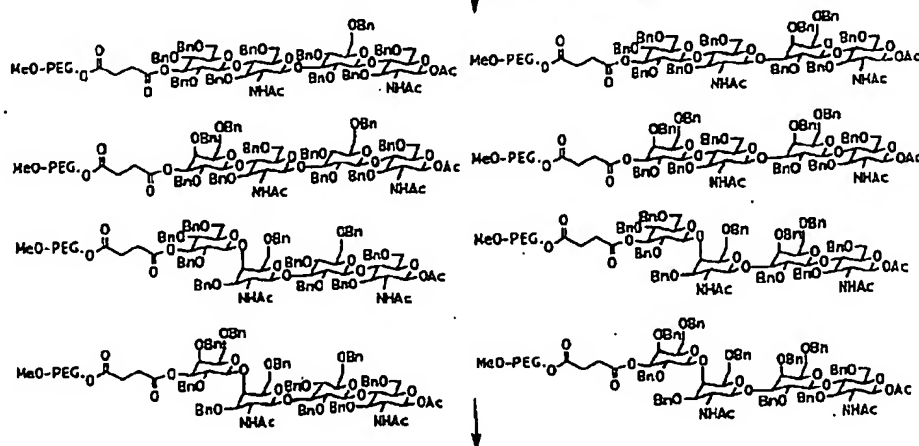
ライブラリー 3  $2^3=8$ 化合物 - フラクション 2

カップリング



上記ライブラリーに対し：

1. NaOMe(cat), MeOH, 0°C  
結晶化による精製
  2. NaH, Cl<sub>2</sub>CH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C.  
結晶化による精製
- カップリング工程：  
3. 12; BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>  
結晶化による精製

ライブラリー 5  
結晶化による試薬からの精製

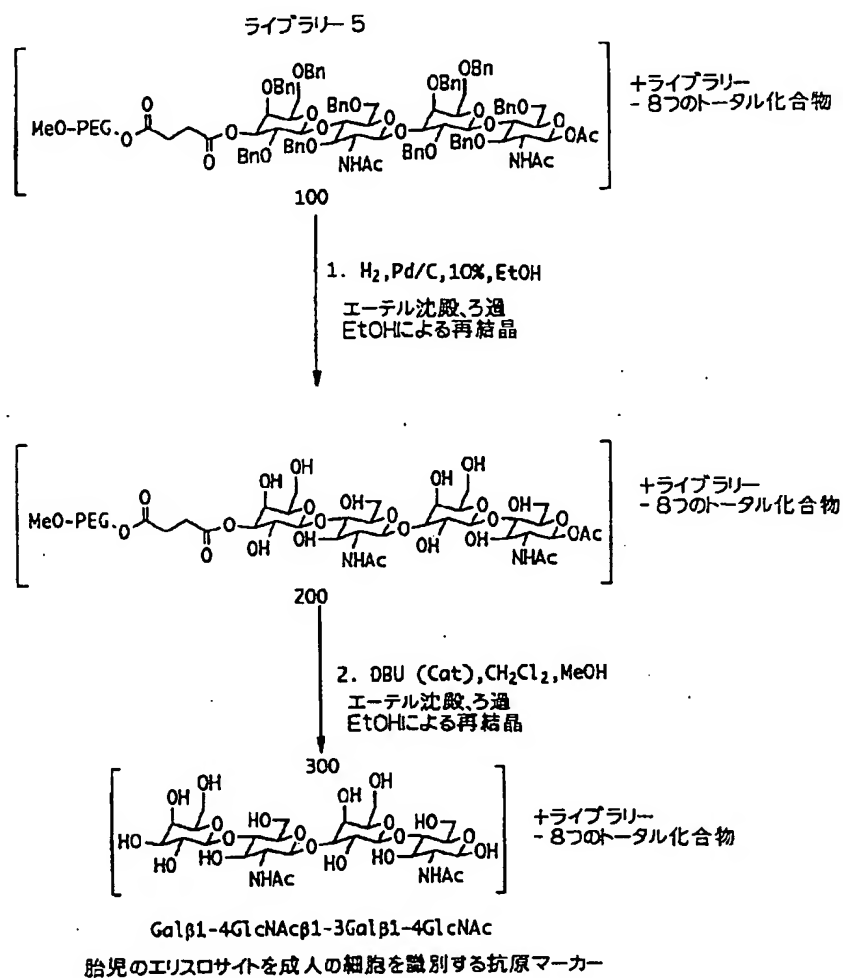
PEG支持体によるライブラリー 4 の分割合成

(103)

特表平10-506379

【図24】

FIG. 24



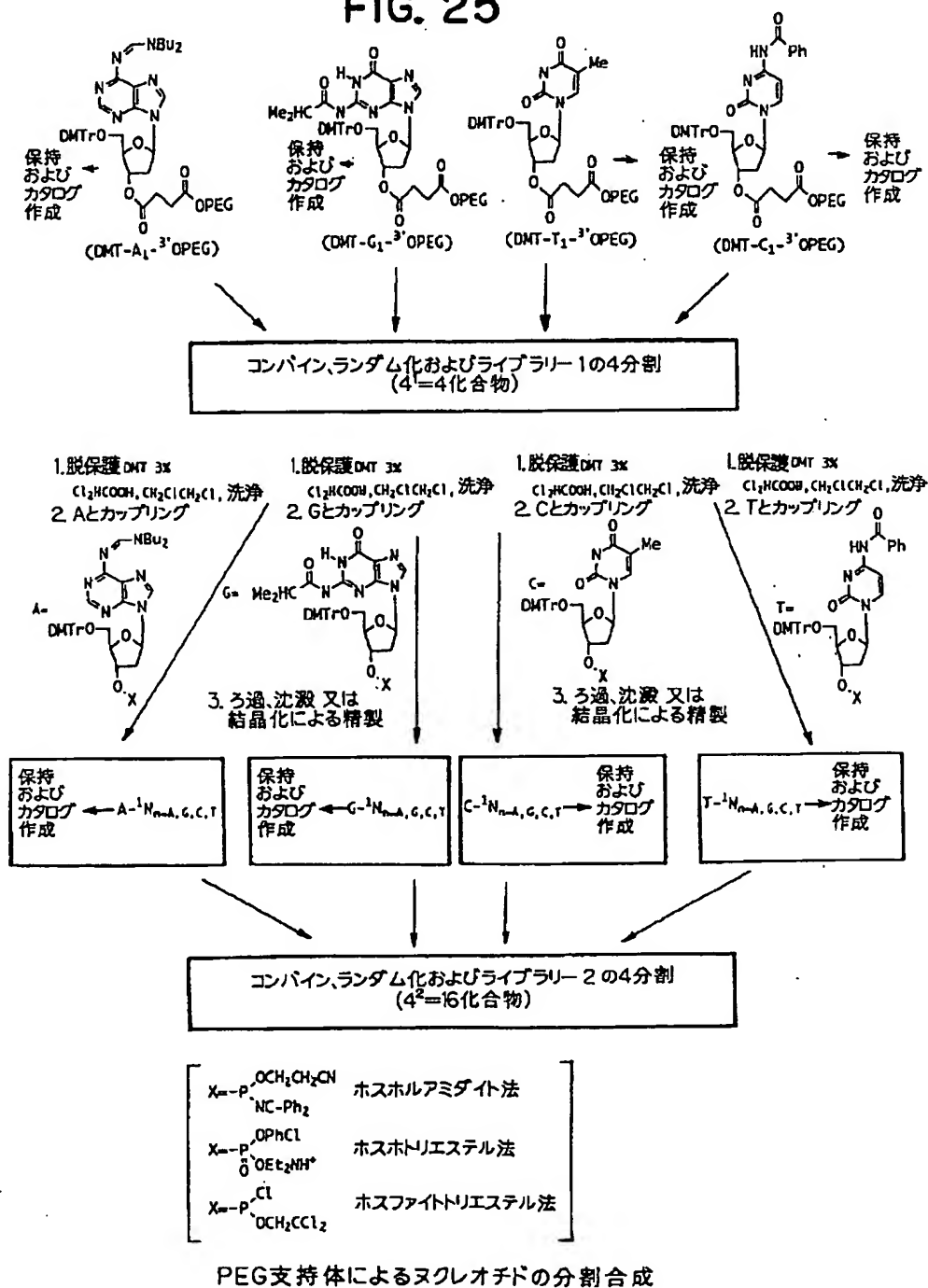
ライブラリー5でのライブラリー最終精製の例

(104)

特表平10-506379

【図25】

FIG. 25

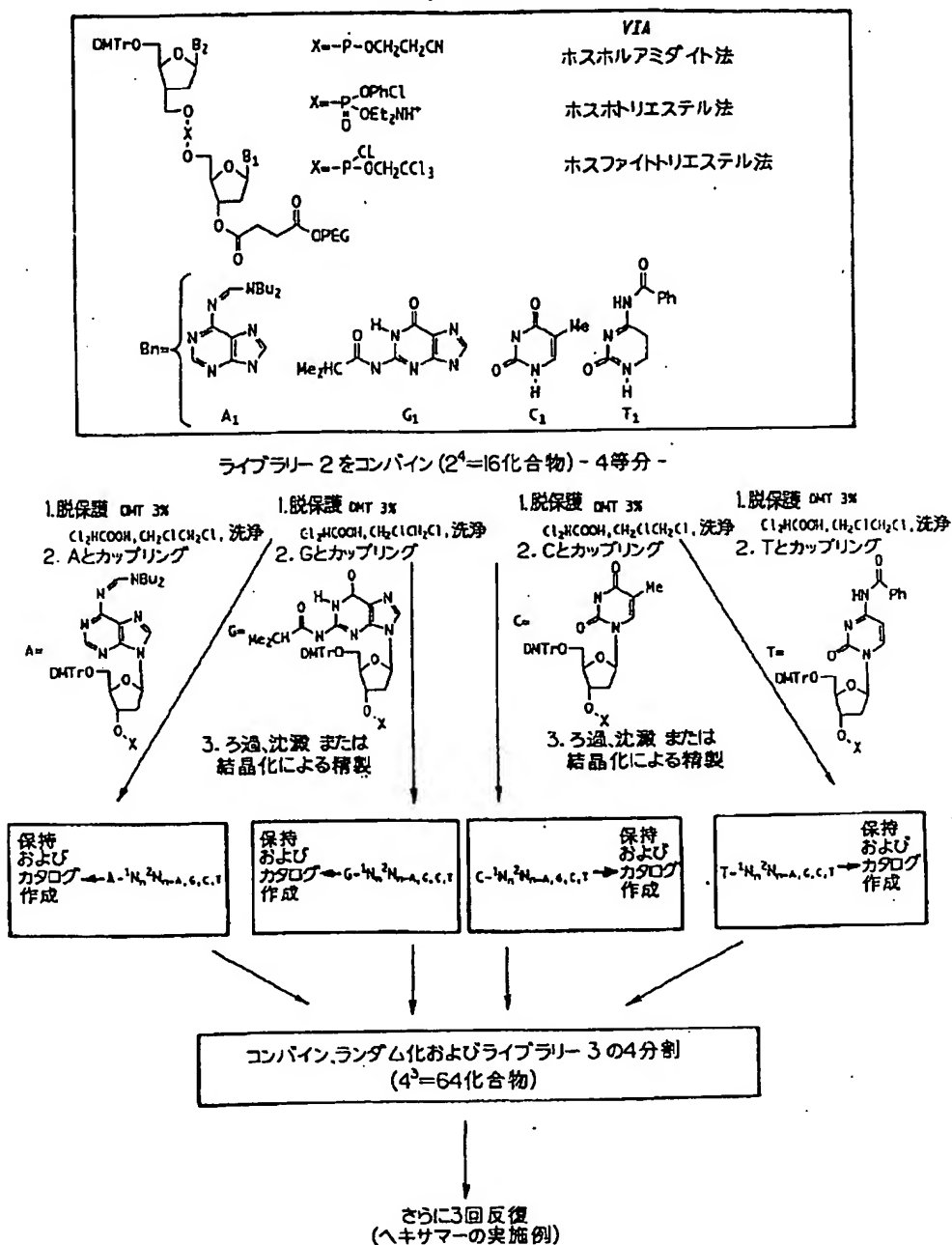


(105)

特表平10-506379

【図26】

FIG. 26



PEG支持体によるヌクレオチドライブラリーの分割合成

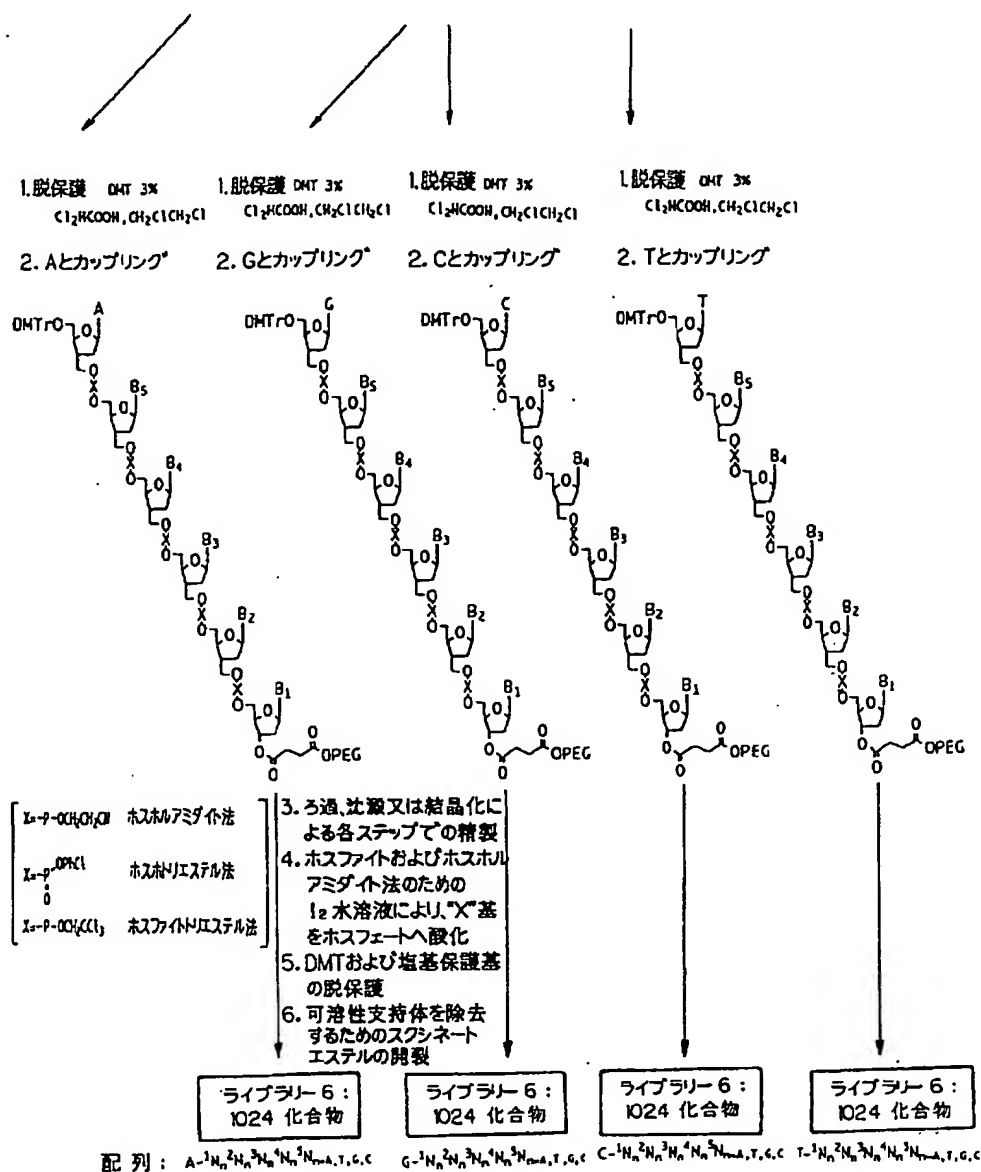
(106)

特表平10-506379

【図27】

FIG. 27

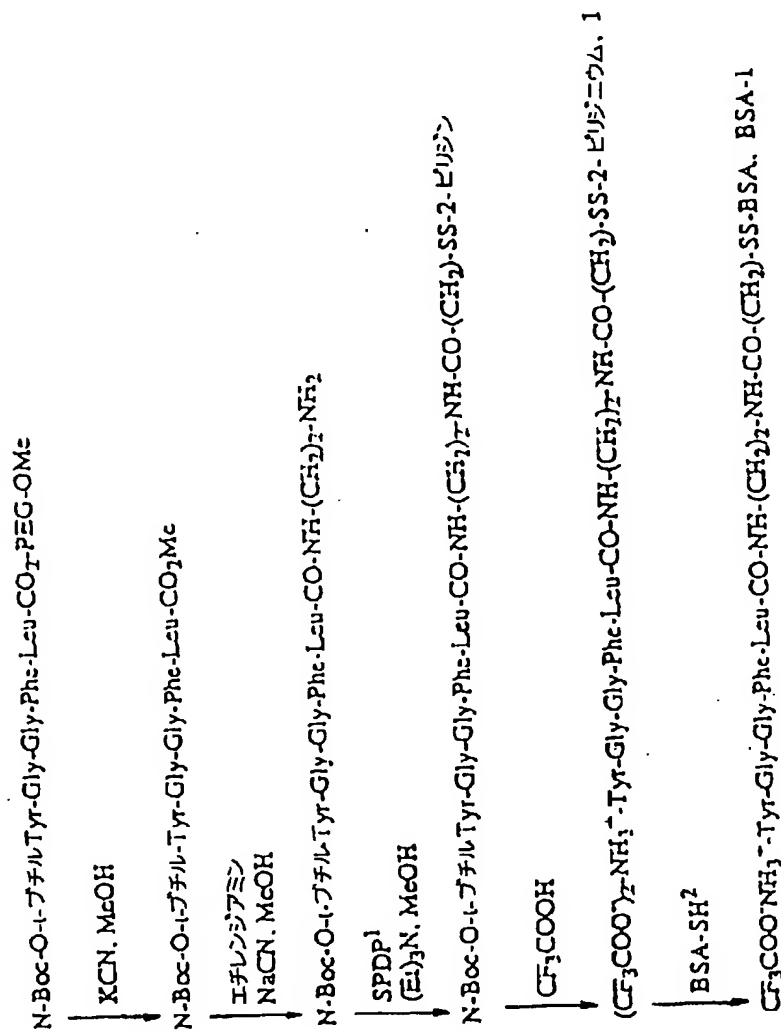
ライブラリー 5(ペンタマー)のランダム化および4分割  
(4<sup>th</sup>=1024化合物)



PEG支持体によるオリゴヌクレオチドのヘキサマーの分割合成

FIG. 28

【図 28】



1: N-スチレンイミジル 3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)

2: ウシ血清アルブミン-SH

(Leu<sup>5</sup>)-エンケファリン-ウシ血清アルブミンコンジュゲートの調製

(107)

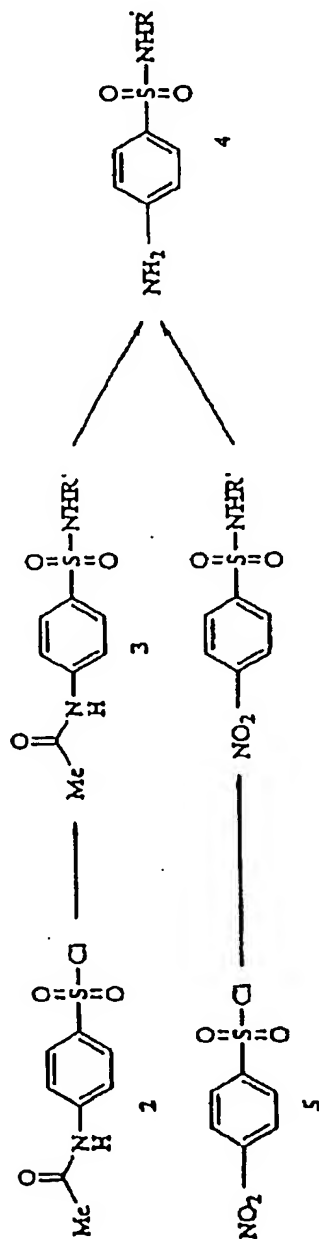
特表平10-506379

【図 29】

(108)

特表平10-506379

FIG. 29



2つの古典的アリールスルホンアミドの調製法

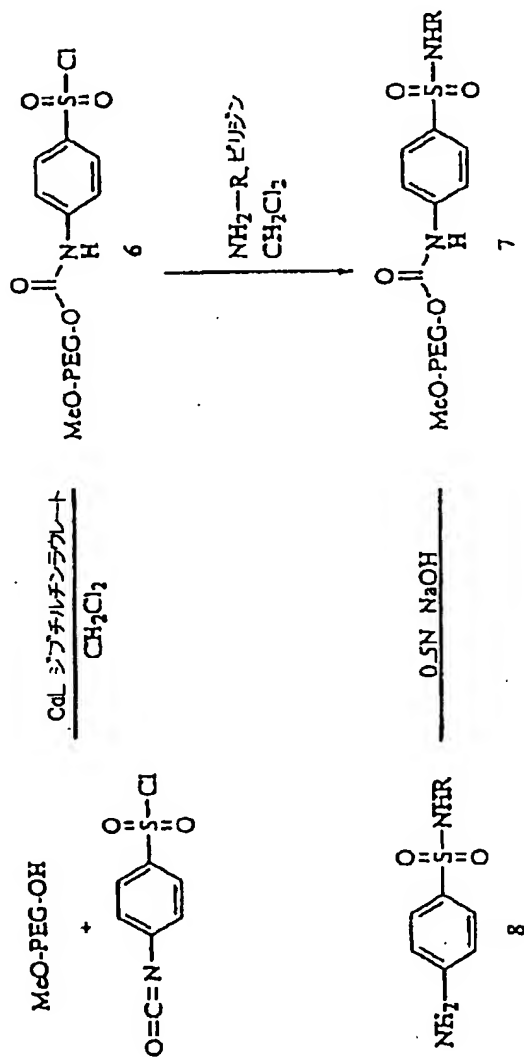


(109)

特表平10-506379

【図 30】

FIG. 30



R=水素、ベンジル、イソブチル、フェニル、2-ピリジル、2-(4,6-ジメチル)ピリミジル

アリールスルホンアミドライブラリーの構築

(110)

特表平10-506379

【図31】

FIG. 31

ライブラリーミクスチャー	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	ライブラリーミクスチャー	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
P(5)		P(2)	
N <sub>(1)</sub> N <sub>(2)</sub> N <sub>(3)</sub> N <sub>(4)</sub> Tyr	46	MeO-PEG-N <sub>(1)</sub> Phe Gly Gly Tyr	0.18
MeO-PEG-N <sub>(1)</sub> N <sub>(2)</sub> N <sub>(3)</sub> N <sub>(4)</sub> Tyr	51	MeO-PEG-N <sub>(1)</sub> Leu Gly Gly Tyr	4.0
MeO-PEG-N <sub>(1)</sub> N <sub>(2)</sub> N <sub>(3)</sub> N <sub>(4)</sub> Leu	>1,000	MeO-PEG-N <sub>(1)</sub> Gly Gly Gly Tyr	19
MeO-PEG-N <sub>(1)</sub> N <sub>(2)</sub> N <sub>(3)</sub> N <sub>(4)</sub> Gly	>1,000	MeO-PEG-N <sub>(1)</sub> Tyr Gly Gly Tyr	32
MeO-PEG-N <sub>(1)</sub> N <sub>(2)</sub> N <sub>(3)</sub> N <sub>(4)</sub> Phe	>1,000		
P(4)		P(1)	
MeO-PEG-N <sub>(1)</sub> N <sub>(2)</sub> N <sub>(3)</sub> Gly Tyr	7.3	MeO-PEG-Leu Phe Gly Gly Tyr	0.034
MeO-PEG-N <sub>(1)</sub> N <sub>(2)</sub> N <sub>(3)</sub> Leu Tyr	>250	MeO-PEG-Phe Phe Gly Gly Tyr	0.049
MeO-PEG-N <sub>(1)</sub> N <sub>(2)</sub> N <sub>(3)</sub> Phe Tyr	>250	MeO-PEG-Tyr Phe Gly Gly Tyr	0.091
MeO-PEG-N <sub>(1)</sub> N <sub>(2)</sub> N <sub>(3)</sub> Tyr Tyr	>250	MeO-PEG-Gly Phe Gly Gly Tyr	0.21
P(3)			
MeO-PEG-N <sub>(1)</sub> N <sub>(2)</sub> Gly Gly Tyr	1.1		
MeO-PEG-N <sub>(1)</sub> N <sub>(2)</sub> Leu Gly Tyr	32		
MeO-PEG-N <sub>(1)</sub> N <sub>(2)</sub> Phe Gly Tyr	54		
MeO-PEG-N <sub>(1)</sub> N <sub>(2)</sub> Tyr Gly Tyr	43		

モノクローナル抗体3E7に認識される抗原決定基 Tyr-Gly-Gly-Phe-Leuを含む  
ペプチドライブラリーの帰納的デコンボリューション

(111)

特表平10-506379

【図32】

FIG. 32

番号	誘導体(R-)	pKa	方法
7a	水素	9.2	A
7b	イソブチル	10.75	B
7c	ベンジル	9.3	B
7d	2-ピリジル	6.82	B
7e	2-(4,6-ジメチル)ピリミジル	4.8	C
7f	フェニル	4.63	C

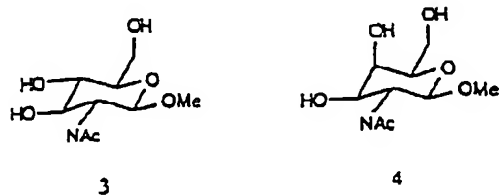
全化合物は<sup>1</sup>H NMRで固定した。NMRスペクトルの4.35ppmにおけるR-プロトンとカルバメートプロトン(-CH<sub>2</sub>O-)の積算(インテグレーション)を、アミンによるスルホニルクロイドの転移反応の程度を決定するために用いた。さらに詳細には、材料と方法の項目および具体的には方法A,BおよびCの項を参照。

(112)

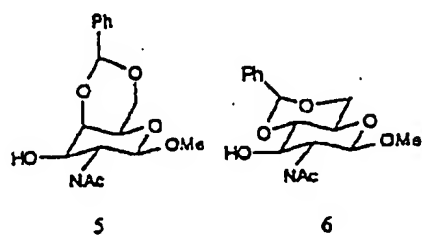
特表平10-506379

【図33】

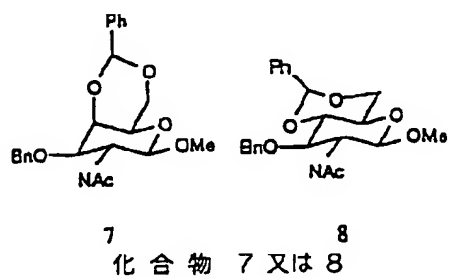
FIG. 33



化合物 3 又は 4



化合物 5 又は 6



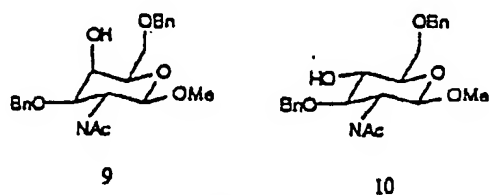
化合物 7 又は 8

(113)

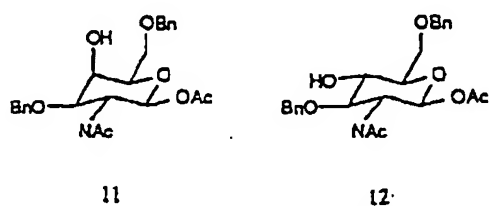
特表平10-506379

【図34】

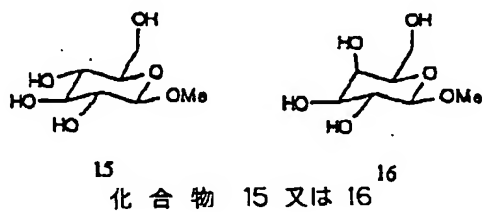
FIG. 34



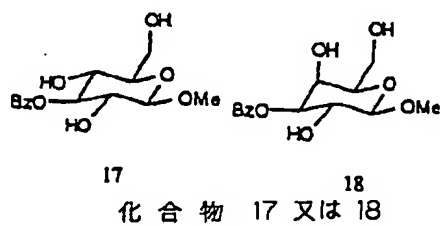
化合物 9 又は 10



化合物 11 又は 12



化合物 15 又は 16



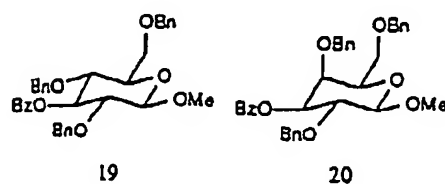
化合物 17 又は 18

(114)

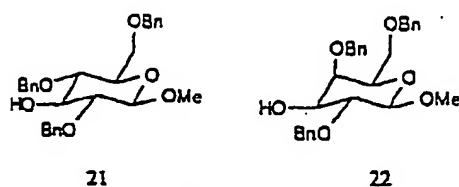
特表平10-506379

【図35】

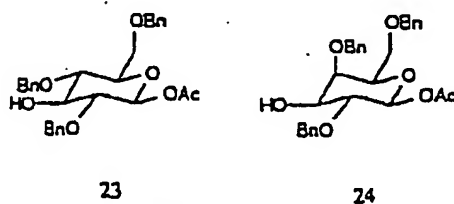
FIG. 35



化合物 19 又は 20



化合物 21 又は 22



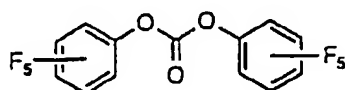
化合物 23 又は 24

(115)

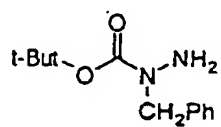
特表平10-506379

【図36】

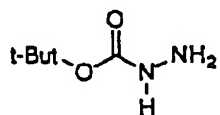
FIG. 36



化合物 501



化合物 502



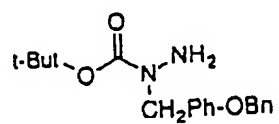
化合物 503

(116)

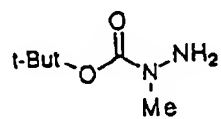
特表平10-506379

【図37】

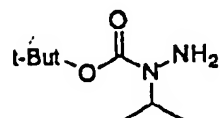
FIG. 37



化合物 504



化合物 505



化合物 506

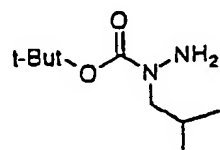


(117)

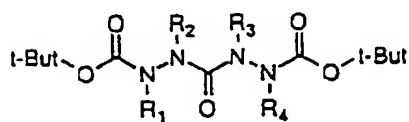
特表平10-506379

【図38】

FIG. 38



化合物 507



番号	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	収率 <sup>a</sup>
1	H	H	H	H	92
2	メチル	H	H	メチル	91
3	H	メチル	H	メチル	90
4	H	メチル	H	ベンジル	89
5	H	メチル	H	イソブチル	90
6	H	イソブチル	H	イソブチル	87
7	H	イソプロピル	H	イソプロピル	86

<sup>a</sup> 単離後の収率

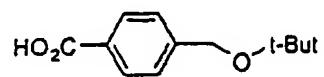
化合物 508

(118)

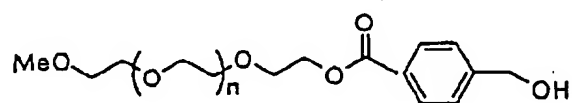
特表平10-506379

【図39】

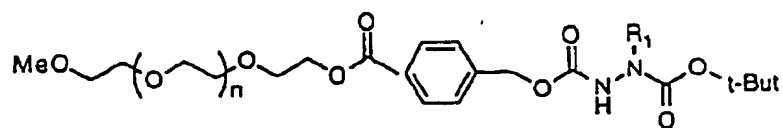
FIG. 39



化合物 509



化合物 510



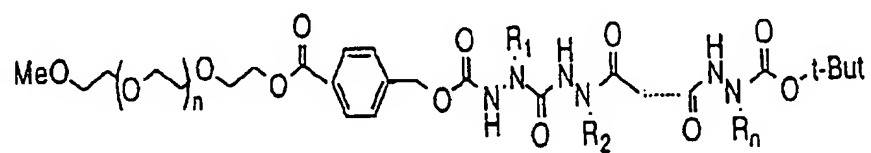
化合物 511

(119)

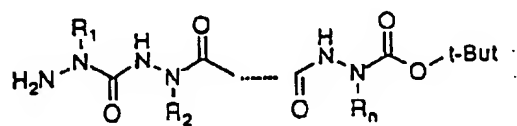
特表平10-506379

【図40】

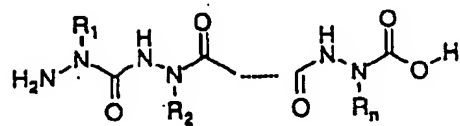
FIG. 40



化合物 512



化合物 513



化合物 514

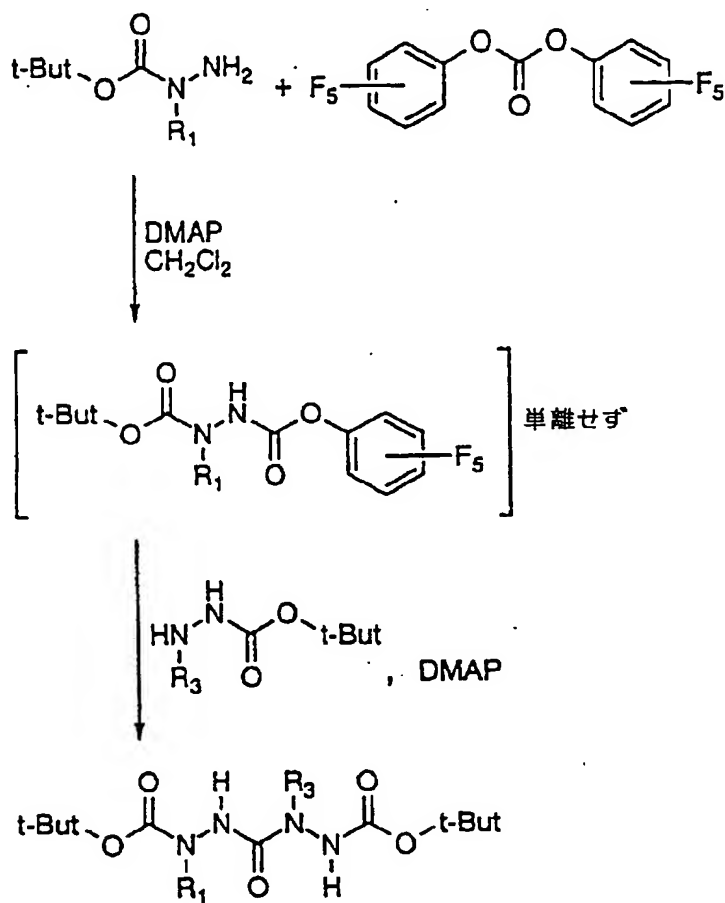
(120)

特表平10-506379

【図41】

## FIG. 41

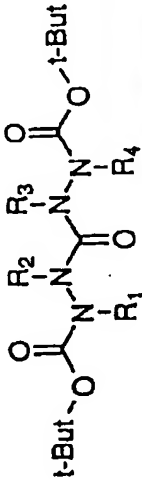
アザ-ジペプチドのワンポット合成



【図 4 2】

FIG. 42

アザ-ジペプチドの合成



番号	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	収率°
1	H	H	H	H	92
2	メチル	H	H	メチル	91
3	H	メチル	H	メチル	90
4	H	メチル	H	ベンジル	89
5	H	メチル	H	イソブチル	90
6	H	イソブチル	H	イソブチル	87
7	H	イソプロピル	H	イソプロピル	86

° 単離後の収率

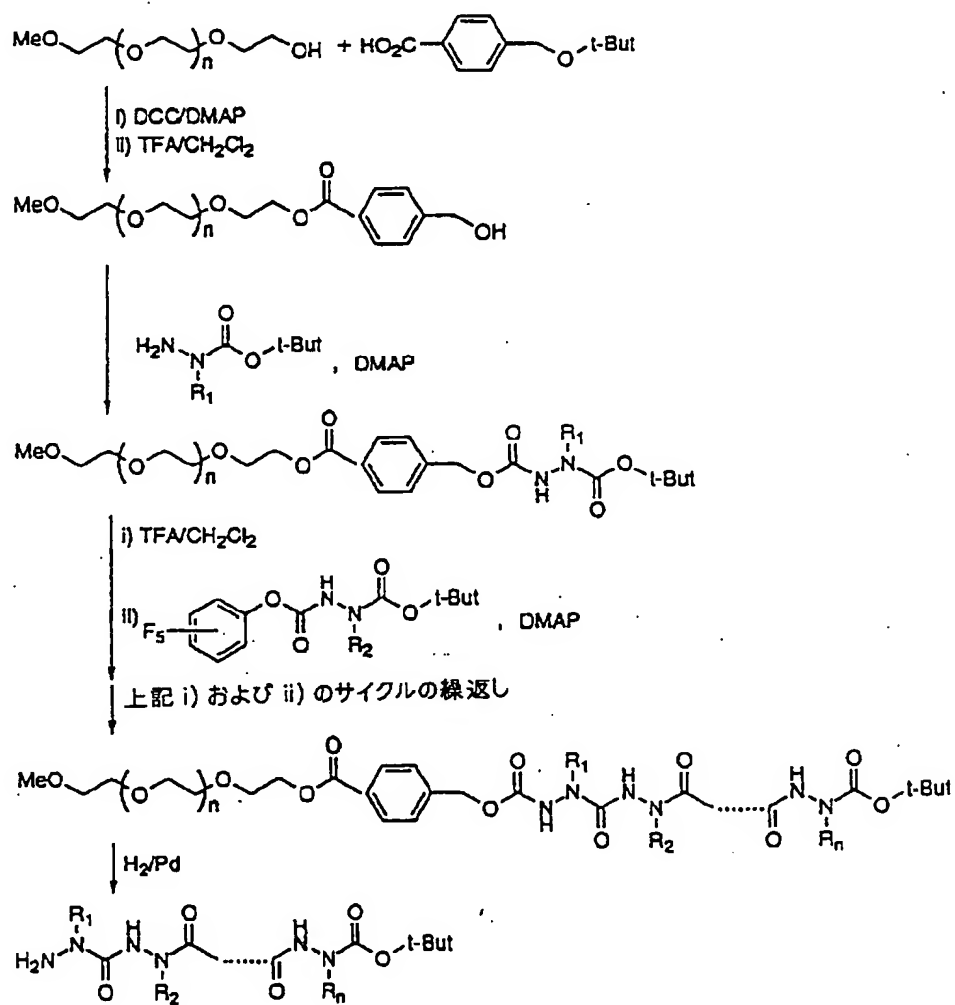
(122)

特表平10-506379

【図 4 3】

## FIG. 43

MeO-PEG支持体上でのアザ-ペプチド合成の概要



(123)

特表平10-506379

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.  
PCT/US 95/09614

 A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C07H21/00 C07K3/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C07H C07K C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,91 19818 (AFFYMAX TECHNOLOGIES, INC.) 26 December 1991 see claims 1-45 ---	1
A	WO,A,92 00091 (BIOLIGAND INC.) 9 January 1992 see page 1, line 1 - page 7, line 20 ---	1
A	WO,A,93 20242 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 14 October 1993 see the whole document ---	1, 19
A	WO,A,93 06121 (AFFYMAX TECHNOLOGIES N.V.) 1 April 1993 see page 1, line 1 - page 5, line 3 --- -/--	1, 19

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \* "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \* "E" earlier document but published on or after the international filing date
- \* "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \* "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \* "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\* "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\* "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step which the document is taken alone

\* "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

\* "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 October 1995

Date of mailing of the international search report

08.12.95

Name and mailing address of the ISA

 European Patent Office, P.B. 3218 Paternoster 2  
NL - 2260 HW Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Scott, J

(124)

特表平10-506379

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 95/09614

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NUCLEOSIDES AND NUCLEOTIDES, vol.10, no.1-3, 30 May 1991 pages 269 - 273 G.M.BONORA ET AL. 'Large-Scale, PEG-Supported DNA Synthesis.' see the whole document ---	1-3,19
A	NATURE, vol.237, 16 June 1972 pages 512 - 513 E.BAYER ET AL. 'Liquid Phase Synthesis of Peptides' see the whole document ---	1-3,19
A	NUCLEOSIDES AND NUCLEOTIDES, vol.12, no.1, 1993 pages 21 - 30 L.DENAPOLI ET AL. 'PEG-Supported Synthesis of Cyclic Oligodeoxyribonucleotides' see the whole document ---	1-3,19

Form PCT/ISA/210 (continuation of annex 2) (July 1992)



(125)

特表平10-506379

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(information on patent family members)

International Application No.

PCT/US 95/09614

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members (i)	Publication date
WO-A-9119818	26-12-91	AU-B- 663055	28-09-95
		AU-B- 8285291	07-01-92
		EP-A- 0535151	07-04-93
		JP-T- 5508321	25-11-93
		US-A- 5432018	11-07-95
WO-A-9200091	09-01-92	AU-B- 659091	11-05-95
		AU-B- 8238591	23-01-92
		CA-A- 2086672	03-01-92
		EP-A- 0542770	26-05-93
		JP-T- 6500308	13-01-94
		NZ-A- 238805	26-07-94
		US-A- 5382513	17-01-95
WO-A-9320242	14-10-93	AU-B- 3944993	08-11-93
		CA-A- 2132103	14-10-93
		EP-A- 0643778	22-03-95
		JP-T- 7505530	22-06-95
WO-A-9306121	01-04-93	AU-A- 2661992	27-04-93
		CA-A- 2118806	01-04-93
		EP-A- 0604552	06-07-94

Form PCT/ISA/210 (patent family sheet) (July 1993)

(126)

特表平10-506379

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>8</sup>

識別記号

F I

C 07 C 303/40

C 07 C 303/40

311/39

311/39

311/47

311/47

C 07 H 15/18

C 07 H 15/18

21/00

21/00

C 07 K 1/04

C 07 K 1/04

// C 08 L 39/00

C 08 L 39/00

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, MW, SD, SZ, UG), AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, C H, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, M N, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN

(72)発明者 ヒュンソー, ハン

アメリカ合衆国カリフォルニア州92122,  
サン・ディエゴ, ショアライン・ドライブ  
7190, アpartment 6101

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**